NOÇÕES

DE

BACTERIOLOGIA

PELO

DR. RODOLPHO GALVÃO

Diplomado pela Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro. Membro da Société Française d'Hygiène de Pariz; da Sociedade de Medicina de Pernambuco; do Instituto Archeologico e Geographico Pernambucano; da Sociedade de Anthropologia e Jurisprudencia Medica, do Rio de Janeiro. Director do «Instituto Pasteur» de Pernambuco e Inspector Geral de Hygiene Publica do mesmo Estado.

PRECEDIDO DE UMA CARTA

DO

DR. BENJAMIN ANTONIO DA ROCHA FARIA

Professor de Hygiene e Historia da Medicina na Faculdade do Rio de Janeiro.

RECIFE

OFFICINAS DO «JORNAL DO RECIFE»

47 — Rua 15 de Novembro — 47

1899

To the eminent Dr. Sternberg, with author's best complements. Recife — May — 1899.

Rio, 5 de Fevereiro de 1899.

Illustre Collega e Sr. Dr. Rodolpho Galvão.

Agradeço-vos, penhoradissimo, a gentileza de vossa carta acompanhando os fasciculos do livro que em bôa hora resolvestes publicar sob o modesto titulo de «Noções de Bacteriologia».

Parece-me a mim, e neste pensar não estarei isolado, que o vosso esforço, rematado em pleno exito, com a impressão desse livro, é digno do melhor apreço de quantos cultivam ou acompanham a sciencia bacteriologica entre nós.

De sobejo ha compendios estrangeiros que desse assumpto se occupam a farta, e as edições que d'elles se renovam, em pequenos intervallos, attestam a curiosidade do mundo medico pelas questões bacteriologicas, solvidas umas, outras em viva controversia no indagar da etiologia e disseminação das molestias transmissiveis. por vezes crudelissimas, no evolver das epidemias.

Para nós, porém, essa abundancia de manuaes, compendios e tratados estrangeiros de bacteriologia, tão grande que mais parece especulativa industria que sciencia pura, traz a quem procura

niciar-se na pesquiza microbiana, hesitações, embaraços, confusão na escolha dos methodos e processos a empregar para chegar sem demora a resultados seguros.

Dessas difficuldades vem o vosso livro em grande parte libertar os neophytos, por explanar o assumpto de modo claro, conciso e methodico, exposição de quem praticamente conhece o que escreve e sabe quão difficil se torna, neste particular, illustrar pela escriptura o que pela experiencia é demonstrado.

Bem haja portanto o vosso livro, que vem prestar valioso serviço aos que estudam, vulgarisando noções de grande monta em biologia e hygiene, e constituir, aos mesmo tempo, eloquente prova de vossa competencia, adquirida no convivio dos laureados mestres da Europa.

Tal foi a impressão que colhi da attenta leitura de vosso compendio; felicito-vos sinceramente pelo modo galhardo com que vos houvestes da operosa empreza, que applaudo, sem restricções.

Amigo e Collega Adm.dor e Obrig.o

B. A. da Rocha Faria.

PREFACIO

> Nous vivons dans un temps oú il est bon de vivre, quand on s'interesse aux choses de la médecine.
>
> BOUCHARD.—*Les microbes pathogénes.*

As *Noções de Bacteriologia* não são mais do que as notas tomadas diariamente pelo seu obscuro author durante o curso de microbia technica feito no correr da phase escolar de 1895—96 no «Instituto Pasteur», pelos professores ROUX e METCHNIKOFF.

Outro merito não tem, pois, este livro senão o de resumir fielmente, embora em estylo laconico, as idéas d'aquelles eminentes bacteriologistas, assim como a excellente technica seguida no «Instituto», cujo ensino fecundo e original attrahe a concurrencia de medicos de todos os pontos do globo, que muitas vezes solicitam com um e mais annos de antecedencia um logar nos ambicionados laboratorios d'aquelle estabelecimento de ensino extra-official, unico em seu genero, não somente na França como no mundo inteiro.

Reunindo em volume aquellas notas destinadas ao Governo do Estado de Pernambuco, que nos commettera honrosa incumbencia scientifica na Europa, não tivemos somente o proposito de demonstrar que cumpriramos conscienciosamente

uma clausula contractual; visamos um fim mais pratico e mais util compendiando noções e processos, que apezar de conhecidos de quantos no nosso paiz dão-se a estudos de microbia, não estão comtudo publicados em livro, formando um corpo de doutrina; mas existem em uma dispersão desoladora para aquelles que precisam consultal-os, por uma infinidade de revistas, memorias e communicações ás diversas associações scientificas e congressos internacionaes.

E' pois a primeira vez que a summa das lições theoricas e praticas professadas no «Instituto Pasteur» apparece compendiada em qualquer lingua; e, fazendo-o em idioma vernaculo, pensamos prestar um pequeno serviço aos collegas brazileiros, que por ventura não tenham tempo de consultar publicações estrangeiras sobre assumptos de bacteriologia, que cada vez torna-se mais indispensavel ao clinico, sob o triplice ponto de vista do diagnostico. tratamento e prophylaxia, tal é hoje a sua importancia na pratica medica.

RODOLPHO GALVÃO.

Pariz—Fevereiro de 1896. (*)

(*) — Este livro escripto em Pariz ha trez annos, só agora pôde sahir á luz da publicidade aqui em Pernambuco, por motivos que não vêm ao caso explicar, mas que não dependeram absolutamente da vontade do author.

Recife—Março de 1899.

R. G.

GENERALIDADES

A expressão «microbio» foi introduzida na sciencia em 1878 pelo conhecido ex-professor da faculdade de medicina de Strasburgo, o Doutor Sedillot.

Nenhuma das denominações que têm sido propostas para designar estes seres infinitamente pequenos, que fazem o assumpto da bacteriologia, foi mais geralmente acceita do que esta, que tornou-se logo popular e que convem tanto ás *bacterias* propriamente ditas, como aos *levêdos*, aos *mofos* ou *bolores* e aos *infusorios*, pertençam esses micro-organismos ao reino animal, ao vegetal, ou ainda ao reino neutro dos *protistas*, como quer Haeckel, que os colloca ao lado das moneras.

O professor Roux define microbio *um ser bastante pequeno para só poder ser visto com o auxilio do microscopio.*

Os microbios existem em toda a parte : na agua que bebemos ; no ar que respiramos ; nas poeiras atmosphericas ; no solo que pisamos ; na superficie do nosso corpo ; no tubo intestinal do homem e dos animaes.

E' mais difficil evital os do que os encontrar para uma demonstração. Nada com effeito mais facil : basta abandonar a materia organica a si mesmo, nas condições ordinarias de temperatura e de humidade, para que ella experimente logo uma alteração devida aos microbios.

Abandone-se ao ar um pedaço de pão humedecido,

que elle não tardará a cobrir-se de manchas negras e esverdeadas, ou de longos filamentos brancos e de aspecto sedoso :—é o que se chama vulgarmente bolor ou mofo, ou antes é a obra de microbios banaes : é o *mucor mucedo*, um microorganismo da familia dos cogumelos.

Dotado de longos filamentos mycelianos quando cultivado sobre o pão, que constitue para elle um excellente meio de cultura, esse organismo torna-se excessivamente pequeno quando cresce sobre outro terreno que lhe convenha menos. Uma tal vegetação ao ar livre é uma prova de que n'esse ar abundam os grãos ou sementes do *mucor mucedo*, que pode ser visivel a olho nú, quando toma um tão grande desenvolvimento.

Examinemol-o ao microscopio para bem conhecer a sua estructura anatomica. Veremos desde logo que elle é formado por tubos entrelaçados, constituindo uma especie de feltragem, de onde partem filamentos aereos brancos, que dão esporos pretos, os quaes estão encerrados em uma membrana e collocados na extremidade do filamento myceliano. Logo que a membrana rompe-se elles se escapam e espalham-se no exterior. Ha diversas variedades de *mucor* : alem do mucedo temos o ramosu, o corymbifero e o rizopodiforme.

Se em logar do pão fizermos a experiencia com uma talhada de laranja, de limão, ou de qualquer fructo acido, outro organismo virá se cultivar ahi : desta vez será o *penicilium glaucum*, que tambem dá filamentos aereos, com esporos na extremidade livre e divide-se dichotomicamente.

Quando parasita das aves este organismo torna-se extremamente pequeno, de modo a poder ser examinado ao microscopio ; justamente como se dá com o *mucor* quando desenvolve-se nas *tinhas*, tornando-se assim parasita do homem.

Um outro cogumelo, o *aspergillus niger*, cultivando-se admiravelmente bem no liquido de Raulin (de que fallaremos adiante), dá esporos sem membrana de envolucro :

a sua estructura, porem, é muito similhante a dos outros dous já descriptos; o filamento aereo intumesce e toma o aspecto de uma esphera; sobre a superficie d'esta nascem fibrillas perpendiculares trazendo os esporos. Este modo de fructificação não é o unico que possuem esses organismos; elles têm um outro: quando dous filamentos se encontram ha conjugação e consequente reproducção, conforme ensina a botanica.

Introduzidos na economia e se desenvolvendo como parasitas dos seres vivos, esses cogumelos nem sempre se apresentam ao observador de modo tão visivel; embaraçados em sua evolução elles modificam se morphologicamente e os esporos não têm mais a mesma construcção dos esporos aereos; finalmente alguns d'elles tambem podem-se tornar pathogenicos, produzindo no homem uma mycose especial.

O *aspergillus fumigatus* parece se muito com o *niger*, apenas os seus esporos têm uma côr mais attenuada. Injectando-se uma cultura d'elle em um cão, a autopsia do animal revellará a existencia de nodulos, em cujo interior encontram-se filamentos, sem fructificação aerea, bem entendido.

Em França os criadores de pombos, especialmente os individuos encarregados de alimental-os ou de ceval-os, (*gaveurs*) são contaminados ás vezes pelos pombos, que são sujeitos a adquirir uma molestia parasitaria, a qual communicada ao homem pode causar hemoptyse, dando logar a erros de diagnostico. Lá chamam a esta molestia «tuberculose aspergillar».

Se é o vinho que deixamos exposto ao ar observaremos na superficie do liquido um véo, uma especie de pellicula, chamada «flôr do vinho», que é produzida por um cogumelo parasitario chamado *mycoderma vini*, pullulando muito bem n'aquelle meio. Observado ao microscopio o *mycoderma vini*, apresenta-se sob a forma de cellulas ovaes, reproduzindo-se por meio de rebentos. Elle desenvolve-se

á custa do assucar, transformando-o em agua e acido carbonico. Estes organismos, possuindo a propriedade de destruir e de transformar o assucar, são chamados *saccharomycetos* e operam essa transformação desprendendo calôr ao contacto do ar, sem fazer entretanto o liquido fermentar.

Se pelo contrario a transformação se fizer ao abrigo do ar, em vez de CO^2 H^2O, teremos então uma fermentação ou a transformação do assucar em alcool.

Examinemos ainda uma infusão de *malt* em via de fermentação ; ella conterá cellulas muito similhantes ás precedentes, reproduzindo-se por meio de rebentos, como o demonstraram Cagniard de Latour e Pasteur, e formando rosarios. O *levêdo de cerveja* não se estende entretanto em véo avelludado como as cellulas do *mycoderma vini* : elle vive na profundeza do liquido, e são as bolhas de gaz, desprendidas pela fermentação, que o arrastam para a superficie.

Sob a influencia do seu desenvolvimento o liquido modifica-se e transforma-se : o assucar n'elle contido desdobra-se em acido carbonico e em alcool ; é esta a sua funcção e o saccharomyceto é o typo do microbio-fermento.

Convem notar a differença que ha entre esses dous cogumelos : um gosta do ar e por isso vive na superficie do liquido ; o outro foge d'elle e refugia-se nas camadas inferiores, onde vai viver á custa do acido carbonico. E' a Pasteur que devemos esta descoberta.

O *mycoderma vini* transforma o alcool em acido carbonico e em agua ; mas se mudarmos as condições de existencia d'esse cogumelo, obrigando-o a viver na profundeza de um liquido assucarado, elle tornar-se-á um *fermento* e agirá exactamente como o *levêdo de cerveja*, transformando o assucar em acido carbonico e em alcool. Assim, segundo as condições de existencia em que forem collocados, os cogumelos exercerão funcções differentes.

Nesta ordem de ideias, e sabendo-se que os mofos, a que alludimos mais atraz, podem se transformar em fermentos, é licito pensar que a origem primitiva desses le-

vêdos talvez tivesse sido um *mofo*, cuja forma inicial perdeu-se ; ou então que ainda não se pôde encontrar toda a serie de transformações. Estas formas de bolor, transmutadas em levêdo, podem, como o *oidium*, uma vez introduzidos no organismo, tornar se pathogenicos.

Vejamos ainda um pouco de vinho exposto ao ar e apresentando na superficie um véo excessivamente fino, muito tenue ; agora é o *mycoderma aceti*, agente da fermentação do vinagre e vulgarmente denominado «mãi do vinagre». Suas cellulas são muito pequenas e só podem ser observadas ao microscopio com um augmento de 300 a 400 diametros : ellas têm as extremidades arredondadas, algumas vezes são ligeiramente estrangulados no meio ; cercando cada elemento existe uma zona glutinosa, ligando-os entre si.

E' a zoogléa, liquido viscoso que cahe no fundo do vaso e forma a «mãi do vinagre». Sob o ponto de vista da reproducção o *mycoderma aceti* é um typo novo : o estrangulamento existente na cellula adulta e de que já fallamos, accentúa-se cada vez mais até dividil-a em duas, que, uma vez separadas, vão constituir dous novos seres autonomos. O *mycoderma aceti* é um *schyzomycete*, planta que se reproduz por scissiparidade.

Uma infusão ou maceração organica, uma infusão de feno, por exemplo, dará tambem bacterias. O liquido, que a principio é claro e transparente, vai pouco a pouco turvando-se : em seguida apparece um véo na superficie, constituido por bacterias providas de zoogléa.

Essas bacterias são compostas de filamentos unidos ponta á ponta ; no centro de uma cellula apparece uma separação, um septo, que a divide em duas, que vão mais tarde viver independentes. A scisão se opera em um espaço de tempo muito curto, e n'essa occasião a cellula deixa de ser redonda para alongar-se : temos em nossa presença um *bacillo*, o bacillo do feno ; elle é movel e tem pequenos filamentos lateraes que servem de orgãos de locomoção, ope-

rando movimentos rapidos: — são os *cilios vibrateis*, que cahem quando a zoogléa invade a cellula. As velhas cellulas perdem, pois, os seus movimentos.

A cellula é constituida por uma membrana de envolucro e o seu conteúdo póde ser posto em evidencia por meio de reactivos. Examinada ao miscroscopio, com um augmento de 600 ou de 700 diametros, a nossa maceração de feno apresentará tambem *infusorios*, ciliados ou não, *monadas* e outros organismos mais complicados, cujo estudo não cabe aqui.

Ao lado d'esses infusorios encontraremos numerosas bacterias: umas alongadas, com as extremidades arredondadas e providas de orgãos de locomoção, como o *bacterium*; outras possuindo sómente movimentos «brownianos»; umas apresentam-se reunidas aos pares; outras estão isoladas; algumas outras estão amontuadas em tulhas.

Umas vivem exclusivamente no ar, são *aerobias*; outras fóra d'elle, são *anaerobias*; certas dentre ellas vivem de ambas as maneiras.

Algumas vivem á custa da materia morta, não fazem mal ao homem, são *saprophytas*; algumas outras nutrem-se, pelo contrario, da materia viva, são *parasitas* e produzem molestias nos corpos a que se agarram.

E' agora a occasião de classificar todas essas especies. A primeira classificação de microbios, de algum valor, foi a de Conh, que baseando-se principalmente sobre as differenças de formas omittio um caracter muito importante como é o da reproducção. Conh classificou assim os microbios:

Sphero-bacterias ou bacterias esphericas, só contendo o genero *micrococcus*.

Micro-bacterias ou bacterias em curtos bastonêtes, contendo o genero *bacterium*.

Desmo-bacterias ou bacterias filamentosas, com os generos *bacillus* e *vibrio*.

Spiro-bacterias ou bacterias em espiral, com os generos *spirillum* e *spirochæte*.

Em uma cellula de bacteria que vai reproduzir-se observa-se um ponto brilhante, com envolucro proprio, que vai pouco a pouco invadindo a cellula até fazel-a desapparecer completamente : é o grão do bacillo, chamado tambem *endosporo* ; é a fórma de resistencia do microbio.

Ao passo que a cellula ordinaria morre rapidamente sob a influencia de ligeiros antisepticos, do calor á 60°, pela deseccação, ou pela exposição prolongada á luz, succede ao contrario, que o *esporo* resiste a todas essas causas de destruição e só morre a 120° de calôr humido. Esta resistencia dos esporos aos agentes de destruição é um caracter muito importante e tem por fim conservar e perpetuar a especie.

Outras bacterias não dão endosporos ; mas porventura serão ellas privadas de fórmas de permanencia ?

—Por certo que não. Geralmente nas bacterias de formas esphericas, nos *cocci* especialmente, uma das cellulas engrossa em todos os seus diametros, suas paredes adquirem uma espessura muito maior do que as das cellulas visinhas, torna-se muito mais resistente do que estas, sem entretanto attingir jamais a resistencia do endosporo. A' esta categoria de bacterias chamou-se *arthrosporadas*, e *arthrosporo* á cellula que desenvolveu-se mais e adquirio maior resistencia do que as outras, garantindo até certo ponto a perpetuidade da especie.

Foi apoiando-se n'esses factos da reproducção e levando tambem em conta a morphologia dos microbios que o Dr. E. Roux propoz a seguinte classificação, cuja principal vantagem é não ter um caracter absoluto de fixidez, e supportar dentro dos seus quadros qualquer alteração resultante de novas descobertas no terreno da reproducção das bacterias.

ENDOSPORADAS

- Formas arredondadas
  - Micrococcus (ochroleucus)
  - Sarcina (Hanser)
- *Formas bacillares*
  - Formas rectas
    - Bacillus
    - Clostridium
  - Formas em espiral
    - Vibrio
    - Spirillum
  - Formas filamentosas
    - Sem bainha
      - Leptotrix
      - Beggiatoa
    - Com bainha
      - Cladothrix
      - Crenothrix
- Divisão longitudinal
  - Pasteuria ramosa

ARTHROSPORADAS

- Formas arredondadas
  - Micrococcus
  - Staphylococcus
  - Ascococcus
  - Streptococcus
  - Leuconostoc
  - Merista
  - Sarcina
- Forma recta
  - Bacterium
- Formas em espiral
  - Spirulina
  - Spirochœte

Como vê-se, esta classificação nada tem de absoluta; tal bacteria que hoje não apresenta a forma endosporada, ou melhor, cuja forma endosporada ainda não é conhecida, poderá mais tarde, depois de investigações mais felizes, apresentar esporos, deixando assim a segunda parte do quadro proposto pelo Dr. Roux, para tomar logar entre os microbios classificados na primeira serie.

Para terminar este capitulo eis aqui algumas particularidades sobre certos germens comprehendidos no quadro precedente :—Quando o bacillo deforma-se para dar o esporo, tomando o aspecto de uma pêra ou de um badalo, é do *clostridium* que se trata. Uma falsa dichotomisação indica o *cladothrix* ; ao passo que divisões longitudinaes, em forma de couve-flôr, denunciam o *Pasteuria ramosc*, que durante muito tempo acreditou-se ser o unico com aquella forma ; mas investigações recentes levam a crêr que ha mais outros. Este micro-organismo é o intermediario entre as bacterias e os mofos.

Quando os microbios apresentam-se empilhados, em tulhas irregulares, é do *staphylococcus* que trata-se ; do mesmo modo deve-se pensar no *streptococcus* quando os germens revestirem a forma de um rosario.

Bacterias se dividindo em cruz e agrupadas por quatro. tomando o aspecto de *páos* das cartas de jogar são as *sarcinas* ou o *merista* ; pequenos grãos em rosarios assim como as massas glutinosas indicam o *leuconostoc*, que tambem póde apresentar-se cercado de uma bainha glutinosa. que constitue para o germen uma especie de casca, ou camada protectora.

Finalmente deve-se ter bem presente no espirito que segundo as condições de cultura e de vida, a forma dos microbios modifica-se muitas vezes ; sendo o polymorphismo das bacterias um facto admittido por grande numero de bacteriologistas da maior authoridade.

MORPHOLOGIA DAS BACTERIAS

SUMMARIO—Parentesco das bacterias com as *cyanophycéas.* — Polymorphismo das bacterias. — Theorias de Conh e de Nœgeli. — Descoberta do *bacillus zopfii.*— Pesquizas diversas.—Pleomorphismo das bacterias pathogenicas.—Estructura das cellulas bacterianas. — Modos de reproducção.

As bacterias têm sido consideradas ora como animaes, ora como vegetaes.

Os primeiros observadores que estudaram esses micro-organismos notaram que muitos d'elles moviam-se e que eram dotados de orgãos de locomoção — os cilios vibrateis — ; d'ahi veio a ideia de classificar os microbios no reino animal.

Assim pensava Lenwenhœck quando descreveo os leptothrix e os vibriões ; sendo esse modo de vêr tambem aceito por Müller, Ehrenberg e Dujardin.

Esta opinião predominou até a epoca em que reconheceu se que certos vegetaes — as algas—por exemplo, são dotadas de uma motilidade bem caracterisada. Mais tarde Davaine, estudando a bacteria do carbunculo, provou que

certas especies microbianas conservavam-se na mais absoluta immobilidade durante todo o cyclo de sua existencia.

Posteriormente os trabalhos de Conh e de Robin deixaram fóra de discussão a existencia de propriedades que identificavam as bacterias com o reino vegetal ; então foram ellas definitivamente classificadas n'esse reino. Hoje todos os naturalistas estão de accordo n'este ponto.

Em que classe, porem, do reino vegetal deverão entrar os microbios? E' ahi que começam as divergencias entre os botanicos modernos.

A principio foram elles classificados entre os cogumelos, porque acreditou-se que, como estes, eram as bacterias destituidas de chlorophylla.

Um exame mais aprofundado mostrou que as bacterias tinham antes mais pontos de contacto com certas algas, do que com os cogumelos, e que se approximavam muito do grupo das *cyanophycéas*. A propria questão da chlorophylla parece estar resolvida : porquanto nota-se que o succo cellular é incolôr, mas a materia corante existe na espessura da cellula ; além d'isso as cellulas das cyanophycéas não apresentam nucleo, como se dá tambem com as bacterias, que são d'elle privadas.

As algas têm entretanto condições de existencia muito diversas. A 50 ou a 60° de temperatura ellas apresentam-se sob a forma de corpos redondos, ou ovaes, revestindo muitas vezes as formas em espiral (esta ultima é mesmo a mais espalhada na natureza) e reproduzem-se por divisão, formando colonias reunidas por membranas ou tunicas glutinosas e dispostas em camadas excentricas. Nas *palmellaceas*, algas chlorophyllianas, encontra-se um d'esses exemplos.

A questão de saber se a evolução d'esses organismos inferiores se faz pela successão de uma serie de formas differentes, em outros termos: o pleomorphismo ou polymorphismo das bacterias, continúa a ser uma questão controvertida ; sustentando uns o monomorphismo ; outros um

pleomorphismo completo; outros, emfim, um polymorphismo mitigado.

Conh, por exemplo, pensa que um bacillo pode transformar-se em leptothrix e que este por sua vez pode dar nascimento a um bacillo e assim por diante. Elle acredita tambem que um coccus pode dar um rosario, mas que um vibrião só poderá dar um vibrião.

Para Nœgeli, o illustre professor de botanica de Munich, as bacterias não representam especies particulares, mas sim uma mistura original de formas, entre as quaes é difficil estabelecer limites precisos e nitidos; d'ahi concluio elle que os microbios constituem uma unica especie immensa, illimitada, sob formas as mais variadas e variaveis: redondas, ovaes, longas, curvas, em espiral, etc., por meio de uma evolução successiva.

Nœgeli pensa igualmente que as differentes funcções das bacterias tambem se poderiam reunir em uma só especie; é assim que para elle, o mesmo microbio que preside á fermentação lactica, poderá em outra phase de sua evolução operar a fermentação butyrica.

Essa theoria exagerada de pleomorphismo originou-se talvez de enganos de observação em culturas liquidas, contendo varias especies não separadas e trazendo por isso grande confusão.

Koch, estabelecendo as culturas em placas, contradictou taes opiniões e fez experiencias não permittindo mais a illusão proveniente do viver promiscuo de muitas especies de micro-organismos na mesma cultura.

Não obstante Kürth conseguio obter um exemplo de pleomorphismo: isolou de um meio em putrefacção uma bacteria oval—o *bacterium zopfii* — e cultivou-a em placas, em caldo, em gelatina, em agar-agar e sobre batatas. Fazendo variar a composição de seus meios Kürth chegou a este resultado:—se o desenvolvimento do microbio é retardado, elle reveste a forma oval; e se levar-se mais longe o

embaraço opposto ao desenvolvimento da bacteria pode-se obter o leptothrix, ou mesmo uma forma espirillar.

Alguns observadores sustentam que os microbios saprophytas são polymorphos, mas que os pathogenicos não o são; entretanto forneceu-se logo a prova do contrario com os coco-bacillos do cholera das gallinhas e do hog-cholera, obtidos sob varias formas.

Emfim, prevaleceo a theoria de que o pleomorphismo é possivel nas bacterias, pathogenicas ou não; e n'este sentido o *bacillus prodigiosus* tem sido considerado ora como bacillo, ora como micrococo.

Quando não foi mais possivel negar-se essas transformações do individuo, pretendeu-se negal-as para as especies, que devem guardar a mais completa nitidez de fronteiras entre si, no dizer dos que sustentam o monomorphismo; segundo esse modo de ver o bacillo da tuberculose não pode ser confundido com o da lepra.

Não ha duvida que a passagem de uma especie para outra é mal definida e a questão continúa aberta, como aliás succede com as raças humanas: branca, amarella e negra, cujo problema ainda não pôde ser claramente resolvido, diz Metchnikoff.

Forçoso é porem reconhecer que de um modo geral os microbios saprophytas, bem como os parasitas, são pleomorphos: em que peze ao merito de Conh, o notavel professor de Breslau, que só admitte o pleomorphismo exterior, e isso mesmo limitado á duas unicas especies; em que peze a Koch e seus seguidores, que não apresentam factos em contrario aos que foram observados por experimentadores da ordem de Ray Lenkeister, de Cienkonowiski e de Zopf, que estão tambem em contradicção com Winogradsky, outro observador distincto, não ha negal-o.

E apezar de tudo, continúa a questão aberta, como dissemos; principalmente depois que reconheceu-se tres formas do bacillo tuberculoso.

Continuemos, porém, a mostrar outros caracteres que

approximam as bacterias das cyanophycéas: um dos mais notaveis está na estructura de suas cellulas.

Sabe-se que toda cellula—animal, ou vegetal—é construida sob o mesmo plano: uma membrana de envolucro, uma massa protoplasmica, um nucleo, com o seu nucleolo; ora, as bacterias, como as cyanophycéas, fazem excepção á regra e não entram n'esse schema, por isso que falta-lhes o nucleo.

A sua membrana é de composição chimica mal definida: no exterior existe uma camada gelatinosa mais ou menos desenvolvida, ás vezes pouco apparente e reunindo os individuos em colonias; como exemplo temos o *pneumococo.* O conteúdo da cellula bacteriana é constituido pelo protoplasma pouco desenvolvido e por uma substancia nuclear que a enche quasi toda, o que fez outr'ora pensar-se que essas cellulas tinham nucleo disseminado no plasma.

Wurtz, que sustenta a opinião precedente, affirma que a cellula tem uma substancia nuclear que se colore melhor do que a massa protoplasmica; ao passo que não é possivel colorir os vacuolos.

Nas cyanophycéas distinguem-se muito bem estas duas camadas—a peripherica e a central—, circumstancia que afasta estas cellulas de qualquer outra cellula animal ou vegetal.

As bacterias ás vezes são dotadas de cilios vibrateis, dispostos nos dous polos ou extremidades; outras vezes os cilios são mais numerosos e espalhados por toda a superficie, como no vibrião do cholera. Nunca, porem, observaram-se nas bacterias movimentos protoplasmaticos.

Quanto á reproducção, faz-se do mesmo modo que nas cyanophycéas: transversalmente nos bacillos; em cruz nos cocos, de modo a formar colonias de *tetracocos;* e por divisões cubicas (nos tres sentidos), o todo reunido por uma massa zoogleica.

A reproducção por meio de rebentos faz-se apenas nos cogumelos e nos levêdos; e quando tem lugar nas bacte-

rias é somente em certas *formas de involução*, quando têm sido desfavoraveis as condições de desenvolvimento; facto que tambem se dá com as cyanophycéas.

Conhecidos todos estes factos deve-se concluir que ha identidade entre as bacterias e as cyanophycéas?

—Pensamos que não; e o mais que se pode avançar é que ha grande analogia entre ambos os grupos, affirmando-se com o professor Metchnikoff: «que de todos os seres vivos são as cyanophycéas que mais se approximam das bacterias.»

As bacterias, com effeito, são em muitos casos endosporadas; ao passo que as cyanophycéas são arthrosporadas: ahi está certamente uma razão em contrario da identidade dos dous grupos.

Em resumo: no estado actual dos nossos conhecimentos sobre este assumpto não se pódem resolver definitivamente algumas questões propostas n'este capitulo: não é porém desarrazoado acreditar que os microbios são talvez microphytas da familia das cyanophycéas, possuindo um pleomorphismo extenso.

CULTURA DOS MICROBIOS

SUMMARIO — Meios de cultura.— Infusões organicas. — Causa da sua alteração.— Geração espontanea.—Esterilisação das infusões organicas. — Meios acidos e alcalinos. — Esterilisação discontinua. — Autoclave. — Separação.— Diluição nos liquidos. — Sementeira fraccionada. — Meïos solidos: suas vantagens. — Preparação das batatas. —Methodo das campanulas. — Methodo dos tubos. — Modo de semear as batatas. — Aspecto de certas culturas. — Modificações operadas nas batatas pelos microbios. — Diversas substancias que podem ser incorporadas ás batatas. — Outros meios solidos.

Em um meio conveniente os microbios pullulam com muita rapidez, conforme já vimos.

Uma infusão de feno, por exemplo, que no primeiro dia é perfeitamente limpida, logo depois apresenta-se turva, porque um grande numero de especies microbianas vem procurar ahi o seu alimento.

Se quizermos estudar uma das especies, o *bacillus subtilis*, por exemplo, nos veremos embaraçados para seguir a

sua evolução e desenvolvimento: porque, estudando-o ao microscopio, veremos numerosas especies, visinhas, ou mesmo bem differentes d'aquelle micro-organismo, ás quaes poderemos attribuir as transformações peculiares ao *bacillus subtilis*. Será então necessario obtermos o nosso microbio em estado de pureza e desacompanhado de querquer outro germen.

A primeira cousa que se deve procurar é naturalmente um meio de cultura, um terreno, sobre o qual o microbio possa vegetar em bôas condições; esse meio pode ser liquido ou solido: pouco nos importa isso por ora, com tanto que elle sirva de alimento ao micro-organismo e que seja preparado com a precisa e indispensavel pureza, exigida no mais alto gráo pela technica becteriologica.

O meio não é indifferente: certas especies vivem bem onde outras não se podem acclimar. Os microbios fazem a escolha dos alimentos que se lhes apresenta, e muitas vezes ligeiras modificações introduzidas na preparação do meio impedem o desenvolvimento de certos germens.

Ja vimos que em geral elles se desenvolvem muito bem sobre as materias organicas, mas não basta isso; precisamos de meios que se conservem puros.

Se fizermos ferver qualquer d'esses meios de cultura, os seres vivos que ahi se acharem morrerão com certeza na grande maioria: entretanto hão de ficar sempre alguns germens mais resistentes, cujo desenvolvimento ulterior irá turvar o liquido, se tratar-se de um meio desta natureza.

Foi justamente baseando-se na observação d'este facto que outr'ora emittio-se e sustentou-se a theoria da *geração espontanea* e que deu lugar a ardentes e memoraveis discussões entre Pasteur e Pouchet, de Ruão.

A materia organica, diziam os que sustentavam a existencia da geração espontanea, é apta para evoluir e dar formas vivas de seres: ella traz em si mesmo poderes capazes de destruil-a; em taes condições é impossivel conserval-a; é inutil preparar a materia organica, desde que

ella traz em seu seio a semente da vida e o germen da destruição.

Durante o anno de 1855 Pasteur emprehendeo uma serie de experiencias celebres que vieram derrocar inteiramente a theoria da geração espontanea.

Elle demonstrou que os pequenos organismos—os microbios—como dizemos hoje, procedem de pais similhantes a si mesmos: fez ver mais que por toda a parte: no ar, na agua, no solo, nas poeiras em suspensão ha germens, e são elles que, cahindo nos recepientes abertos ou mal fechados dão origem aos seres que ahi se desenvolvem depois.

Se prepararmes um caldo de carne nas mesmas condições em que as cosinheiras o fazem e o guardarmos em um recipiente arrolhado com algodão, o caldo conserva-se-á transparente e conseguintemente puro.

Foi isso que Pasteur demonstrou e expoz em sua celebre memoria sobre a geração espontanea, que como dissemos, deu origem á notavel e apaixonada polemica scientifica entre o grande Mestre, de um lado, e sabios do merecimento de Pouchet, Joly e Treeul, do outro.

— Agindo por esta forma, objectavam os antagonistas de Pasteur, vós matais a força germinativa da infusão: a ebullição modifica a materia organica!

— Não, replicava-lhes Pasteur. E para provar-lhes a sua negativa desarrolhava o vidro e logo o liquido turvava-se, porque os germens exteriores cahindo sobre o conteudo do vaso começavam a se nutrir e a proliferar. Provado estava que a força vegetativa d'aquelle liquido não tinha sido destruida e o que lhe faltava era a semente.

Em um balão de gargalo comprido Pasteur introduzia o liquido nutritivo, que era fervido em seguida, juntamente com o vaso; depois alongava o gargalo á lampada, curvando-o em forma de pescoço de cysne, deixando, porém, na extremidade livre um orificio muito estreito, por onde o ar podia penetrar, depositando as poeiras que traz em suspensão nas paredes sinuosas do gargalo.

Em quanto o vaso mantinha-se na sua posição natural com o liquido em repouso, este conservava-se limpido indefinidamente ; mas logo que, por um movimento proposital, inclinava-se o balão, de modo a pôr o liquido em contacto com as paredes impuras do gargalo, onde se achavam depositados os germens fecundos trazidos pelo ar, o conteudo do vaso turvava-se, transformando-se em rica cultura microbiana.

Estas memoraveis experiencias eram feitas perante uma commissão presidida pelo celebre chimico J. B. Dumas ; ellas foram decisivas e desde aquelle momento a theoria da *geração espontanea* cessou de existir.

Este apparelho tão simples que acabamos de descrever, é o mesmo, com ligeiras variantes, de que ainda hoje se servem todos os laboratorios para taes experiencias.

Adquirido este ponto, isto é : que podemos obter meios de cultura conservando-se indefinidamente puros, precisamos saber em que condicções se consegue esse resultado.

O agente empregado para a esterilisação dos meios de cultura é o calôr. Desde já, porém, devemos fazer a distincção entre calôr *sêcco* e calôr *humido*. Emquanto que o calôr sêcco para ser efficaz precisa ser elevado a um gráo em que destroe a materia organica, o calôr humido actúa do mesmo modo a um gráo muito menos elevado, que não chega a decompor a materia organica.

Para matar-se, por exemplo, os esporos do *Penicillium glaucum* não são precisos menos de 150° e mesmo 180 gráos de calôr sêcco. Em presença do vapor d'agua sob pressão obtem-se o mesmo resultado com 100 ou 115 gráos.

Entretanto com a temperatura da ebulliçao d'agua, a 100 gráos, nem sempre se consegue a esterilisação. Se é certo que no estado vegetativo as cellulas morrem, os esporos que têm uma resistencia muito maior, escapam ; elevando-se, porém, essa temperatura a 115 gráos durante uns

20 minutos, não ha esporo, de quantos conhecemos presentemente, que deixe de succumbir.

A urina, materia muito alteravel, aquecida a 100° consèrva se indefinidamente ; ao passo que o leite nas mesmas condições não tarda muito a coagular-se.

Este facto é devido a ser o leite neutro, ou alcalino ; emquanto que a urina é acida ; a maior parte das especies microbianas vive facilmente nos meios alcalinos.

Bastian, medico inglez, depois de ter aquecido urina a 100° deixou cahir por acaso um pedaço de potassa dentro do vidro que continha a urina. Logo que o meio tornou-se basico os microbios começaram a pullular : invocou-se este facto em favor da geração espontanea.

Veio Pasteur e cortou immediatamente a questão, explicando que, alcalinisando-se aquelle meio, tinha-se pura e simplesmente facultado aos esporos que não morreram a 100° e que não vivem em um meio acido, as condições para se desenvolverem.

Ha portanto germens, resistindo a 100° e não se desenvolvendo em um meio acido, que podem dar a illusão de uma esterilisação, que para ser real, deve n'este caso ser elevada a 115° ; isso por via de regra.

Certas substancias usadas como meios de cultura não supportam, porem, um calôr a 180° ou mesmo a 115° (humido) sem se alterar.

Pode-se, entretanto, por um artificio conseguir esterilisar taes substancias recorrendo-se ao methodo dos *aquecimentos successivos* ou *aquecimento descontinuo*, que consiste em aquecer-se a um gráo relativamente baixo e durante uma ou mais horas de cada vez, em dias successivos.

Tyndall, author do processo, explicava a esterilisação da seguinte maneira : os organismos e as cellulas vegetativas morrem, supponhamos, a 100° : uma vez resfriado o liquido, os germens que escaparam ao primeiro aquecimento proliferam ; um segundo aquecimento mata esses novos individuos, nascidos dos esporos, e assim successivamente.

A theoria é seductora e até certo ponto racional, mas talvez não seja verdadeira; sendo provavelmente a explicação esta outra: o ser organisado que na primeira vez resistio a uma causa de destruição, vai-se enfraquecendo e acaba por succumbir, se é submettido á mesma causa duas ou mais vezes successivas.

Entre as substancias que não suppportam altas temperaturas e que são usadas nos laboratórios citaremos a gelatina e o serum.

Acima de 115° a gelatina não prende-se ás paredes dos tubos ou das placas (phenomeno que se deve evitar, como veremos mais adiante); então recorre-se ao processo *discontinuo:* cada vez, durante tres dias consecutivos, aquece-se a substancia por espaço de 15 minutos, á 100°; findo o ultimo aquecimento o meio está completamente esterilisado.

Com o serum é preciso procedermos com muito cuidado, operando a uma temperatura muito menos elevada, para evitar que elle se coagule, o que tem logar a 0°. Por isso aquece-se a 58° durante um periodo de quatro a oito dias e durante tres horas em cada dia.

O apparelho para a esterilisação pelo calor é o *autoclave*, apparelho indispensavel a qualquer laboratorio, mesmo mediocremente installado.

É uma marmita de Papin, um pouco mais complicada, possuindo um manometro e um thermometro regulando respectivamente a pressão e a temperatura internas do apparelho, que é aquecido a gaz, como aliás devem ser todos os apparelhos de um bom laboratorio.

Uma tampa se adapta á marmita por meio de parafusos; um anel de borracha entre a tampa e a marmita permitte a obturação hermetica.

Na parte superior da tampa ha uma torneira e uma valvula de segurança.

No interior da marmita existe um cesto de arame de cobre, munido de tres pés, de modo a ficar um intervallo

entre o fundo do cesto e o da marmita; n'este cesto é que são collocados os objectos a esterilisar.

Para fazer-se funccionar o apparelho começa-se por deitar um pouco d'agua na marmita, de modo a tocar apenas o fundo do cesto metallico; em seguida collocam-se n'este os objectos a esterilisar. Os liquidos não devem encher completamente os recipientes, afim de que durante a ebullição as rolhas não sejam attingidas.

Todos os objectos que tiverem de ser esterilisados no autoclave devem ir para dentro humidos; os balões e tubos de vidro devem conter um pouco d'agua.

E' dos mais simples o manejo do autoclave, devendo se entretanto attender a certas regras. Uma vez collocados os objectos no cesto metallico e apertados os parafusos solidamente, abre-se a torneira collocada no alto da tampa e approxima-se um phosphoro inflammado dos tubos de gaz, *antes de abrir-se a torneira que dá passagem a este*; sem esta precaução, isto é: abrindo se a torneira e em seguida chegando-se o phosphoro acceso ao nivel dos bicos, se dará uma explosão, que pode queimar a mão do operador. Este phenomeno é proveniente da mistura do gaz com o ar atmospherico.

Pouco a pouco a temperatura da agua contida no interior do apparelho eleva-se até a ebullição, o que se conhece pela sahida do vapor d'agua, que se escapa pela torneira da tampa; todo o ar existente no interior vai sendo expellido pelo vapor. Quando o jacto de vapor é bem continuo e produz, por occasião de sua passagem um ligeiro assobio, pode-se ter certeza de que não ha mais ar no interior do apparelho e fecha-se então a torneira. Se no interior ficasse ainda um pouco de ar não haveria concordancia entre a temperatura e a pressão: portanto a torneira só deve ser fechada quando dentro da marmita não houver mais ar.

Quando o manometro marcar 115º, ou a temperatura que se quizer obter, diminue-se a chamma de gaz até que o gráo de calôr se conserve estacionario. Em geral 15 minu-

tos é um espaço de tempo sufficiente para que a esterilisação seja completa; pode-se, porém, para mais segurança prolongar a operação até 20 minutos.

Apagado o gaz espera-se que a temperatura desça a 100° para abrir-se então o apparelho, afim de evitar que, com a diminuição brusca de pressão, os liquidos se agitem tumultuariamente e vão tocar ás rolhas.

Agora que ja temos um meio absolutamente puro, vamos procurar obter uma cultura de uma dada especie microbiana nas mesmas condições.

Para isso serve-se o experimentador de tubos communs de experiencias, usados nos laboratorios de chimica, contendo cerca de 10 centimetros cubicos do liquido nutritivo e previamente esterilisados, segundo a technica que acabamos de expor. Os tubos são tampados com uma bucha de algodão.

Toma-se uma gotta da cultura impura, com o auxilio de uma varinha de vidro, ou de outro instrumento que a isto se preste, sempre previamente esterilisado, e deixa-se cahir no liquido contido no tubo, que será designado pelo numero 1. Agita-se bem o tubo e temos ahi uma primeira diluição. D'esta toma-se uma segunda gotta, sempre com as mesmas precauções, e semea-se um outro tubo, que terá o numero 2, e assim por diante até á 6ª, 7ª ou 8ª diluição, na qual je se encontram muito poucos microbios, facilitando assim o encontro do germen que procuramos.

E' este o methodo das diluições, ou das sementeiras successivas.

Em vez de liquidos, nós poderemos lançar mão dos meios solidos, e hoje é mesmo o processo mais seguido pelos bacteriologistas.

A batata, conhecida entre nós por batata ingleza, constitue um excellente meio de cultura, porquanto contem uma substancia hydro-carbonada, amydon, saes diversos, materias azotadas, etc. E' finalmente um meio simples,

de facil acquisição e que reune todas as boas condições para nutrir os microbios.

Escolhe-se uma batata de casca bem lisa, sem olhos, ou que não esteja grelada; começa-se por laval-a, esfregando-a com uma escova dura, com o fim de desembaraçarmo-nos da terra e outras impurezas adherentes á casca.

Em seguida colloca-se a batata em um crystallisador contendo uma solução de sublimado a 1/2000, onde as batatas ficarão immergidas durante uma hora; passado esse tempo cosinham-se as batatas e, finda a cocção, são ellas, assim duplamente esterilisadas, collocadas em outro crystallisador, forrado por uma rodella de papel mata-borrão, imbebido na solução de sublimado.

Com uma faca que tem-se previamente esterilisado na chamma de um bico de gaz, divide-se a batata em duas partes iguaes, devendo-se ter o cuidado de deixar a faca esfriar antes de servir-se d'ella: do contrario parte da polpa adhere á lamina e o córte não sahirá nitido.

O operador tem disposto antes á sua esquerda o vaso que deve receber as culturas; e á direita um outro vaso com a solução mercurial, na qual elle lava a sua mão esquerda que tem de segurar a batata. Um ajudante levanta um pouco a tampa do vaso em que estão os tuberculos, de onde o operador tira um d'elles e com a faca esterilisada toma um pouco da *semente* e estende-a sobre a superficie que resulta da divisão da batata, como quem distribue manteiga em uma fatia de pão. D'esta batata, assim *semeada*, toma-se uma pequena particula da polpa, que se espalha do mesmo modo em uma segunda batata; esta fornecerá a semente para uma terceira e assim successivamente, até oito ou dez culturas, obtendo-se por este meio uma serie de dynamisações da semente primitiva, analogas ás diluições que já estudamos atraz para os meios liquidos. Os microbios semeados crescerão fixados, por assim dizer, ao solo que se lhes forneceo, formando grupos de colonias, que apresentam aspectos curiosos e caracteristicos.

Emquanto os micro-organismos proliferam, o vapor d'agua contido na batata condensa-se na tampa do crytallisador, com tendencia a formar gottas ; para evitar que estas caiam sobre a preparação inclina-se um pouco o systema, ou então guarnece-se o céo interior da tampa com uma rodella de papel hydrophilo.

As batatas foram cosidas a 100°: mas já sabemos que esta temperatura não extingue todos os germens, principalmente o *bacillo da batata*, que poderia desenvolver-se e invadir a preparação, mascarando-a ; por este motivo é que deixa-se o tuberculo durante uma hora merguIhado na solução de sublimado, que completa a esterilisação.

Este é o processo de Koch e que incontestavelmente marca um progresso notavel na technica bacteriologica ; entretando alem de ser um tanto moroso e complicado, tem o inconveniente, e não pequeno, de poder deixar a preparação, ser invadida pelos germens exteriores, todas as vezes que para semear, ou por motivos de estudos, se tiver necessidade de levantar as tampas dos crystallisadores ; pelo que esse methodo quasi não é mais seguido nos laboratorios.

Muito mais pratico, mais simples e offerecendo uma segurança e uma commodidade completas é o *processo dos tubos*, imaginado pelo professor Roux, methodo preferido geralmente hoje.

Eis aqui em que consiste o processo de Roux : toma-se uma batata lavada em agua commum e sem precauções especiaes e cortam-se as duas extremidades do eixo mais longo. Com um instrumento, especie de saca-bocado de de forma cylindrica, tira-se da batata um cylindro da massa que vem já dividido em duas partes, no sentido longitudional, pelo septo existente em uma das extremidades do saca-bocado (*emporte-pièce*) que é introduzido verticalmente na batata de alto a baixo.

Aliás, na falta d'este instrumento, a operação pode ser feita com o auxilio de qualquer outro instrumento cortante.

Os pedaços ou meio-cylindros de batata são lavados em agua commum, enxugados em papel *buvard* e collocados, cada um, dentro de um tubo, dito de Roux. São tubos um pouco mais calibrosos do que os tubos ordinarios de ensaio e que têm um pequeno estrangulamento em sua parte inferior.

Arrolhados com algodão são os tubos collocados no autoclave, onde ficam durante vinte minutos expostos com o seu conteudo, a uma temperatura de 115 gráos, sufficiente para esterelisal-os.

Terminada a operação estão os tubos promptos para receber as *sementes*. Com uma espatula de platina, de pequenas dimensões, e previamente passada pela chamma, toma-se um pouco da semente a espalhar na superficie plana do semi-cylindro de batata e risca-se de dentro para fóra e de baixo para cima com a platina assim carregada dos germens, um traço em zig-zag, na polpa da batata. Fecha-se o vidro com algodão e cobre-se este por sua vez com uma carapuça de borracha, para evitar-se a queda de poeiras sobre o algodão; depois collocam-se todos os tubos semeados e assim preparados em uma estufa, cuja temperatura é de 37 gráos e onde as culturas fazem-se bem e rapidamente, conservando-se em bom estado durante muito tempo.

O estrangulamento que se nota no tubo retem a agua que cahe por occasião do aquecimento e vai assim entretendo a humidade na preparação, sem o que esta seccaria, ficando imprestavel; a carapuça de borracha impede por seu lado que a humidade se evapore e que os esporos de certas especies de mofo, cahindo sobre o algodão germinem, dando filamentos que atravessem a trama da bucha, vão mais tarde contaminar com os seus esporos a cultura.

Emfim pode-se empregar ainda a batata sob a forma de uma pasta, á qual se podem juntar tambem outras substancias que modifiquem o meio, augmentando, ou diminuindo o seu poder nutritivo. E' sabida a maneira delicada pela qual os meios reagem sobre os microbios e vice-

versa : para facilitar ou para difficultar o desenvolvimento dos germens pode-se introduzir nos *substrata* de cultura . peptonas, assucar, saes, acidos, e tudo quanto se quizer ; mas depois de taes addições não se deve esquecer que todo e qualquer meio destinado á cultura dos microbios deve ser antes esterilisado no autoclave de Chamberland.

Não são as batatas a unica materia usada nos laboratorios para as culturas solidas ; outras muitas substancias se prestam a isso : as cenouras. as beterravas e quasi todos os legumes preenchem bem a funcção de nutrir os microbios, que, conforme já dissemos. sabem manifestar as suas preferencias por tal ou tal alimento.

E' assim que o *staphylococcus pyogenes aureus*, preferindo as materias assucaradas, dá as colonias mais densas e mais bellas sobre as cenouras e sobre as beterravas.

Os pedaços de madeira secca, os galhos mortos que cahem das arvores, quando humidos. constituem um solo propicio para a vegetação de certas variedades de cogumelo.

A citar ainda : o pão sobre o qual já vimos o *mucor mucedo* cultivar-se de proferencia ; o pão azymo, sobre o qual o *bacillo de Kiel* dá uma cultura muito caracteristica. com uma bella côr vermelho-escarlate ; este germen quando desenvolve-se sobre as hostias causa assombro aos devotos, que acreditam ser aquillo sangue ; facto que já tem dado logar a grosseiras e calculadas mystificações. Temos ainda as pastas feitas com amydon, fecnlas, differentes farinhas de varios cereaes, trigo, arroz, milho, etc.. constituindo todos bons meios de cultura, uma vez que sejam preparados com todas as precauções antisepticas.

Microbios ha que transformam directamente o amydon em agua e acido carbonico e algumas vezes em assucar. Primeiramente elles liquefazem o amydon, depois levam mais longe a transformação, chegando mesmo até a fabricação dos acidos lactico e butyrico.

Quando estes ultimos productos apparecem em abun-

dancia sobre o terreno das culturas, em regra geral a proliferação dos germens não continúa. porque a acidez é contraria a vida de um grande numero de pequenos organismos. Remove-se, porém, este inconveniente muito serio, neutralisando-se o acido que vai-se formando no decurso da evolução da cultura, com um pouco de carbonato de cal, ou outro sal basico.

Uma cultura da *bacteridia do carbunculo* sobre amydon fará a principio a liquefacção da pasta ; depois produzir-se-á assucar e finalmente apparecerão os acidos : n'esta occasião suspende-se a cultura. Formar-se-á um sal de cal e teremos como ultima producção. crystaes de acetato de cal, facilmente descoberto pelas suas reacções e caracteres proprios.

Todavia esses meios solidos de cultura, que incontestavelmente são de uma grande utilidade quando se quer obter com rapidez grandes colonias microbianas, são infelizmente de uma conservação difficil, quando se quer, ou se precisa guardal-as durante periodos de tempo mais ou menos longos. Não ha então outro remedio senão recorrer-se aos meios liquidos. dos quaes vamos tratar no capitulo immediato.

CALDO DE CARNE

SUMMARIO — Modo de preparar o caldo. — Repartição pelos vasos de cultura.— Esterilisação dos vasos.— Matraz-distribuidor. — Diversas formas de vasos. — Maneira de semear o caldo. — Aspecto das culturas.— Modificações produzidas pelos microbios. — Modo de recolher o caldo com a pipetta.— Tubos afilados.— Caldo preparado com diversos orgãos.—Infusão diversas. — Meios artificiaes.— Liquidos de Pasteur e de Raulin.—Licor de Conh. —Vantagens dos meios liquidos.

A' frente dos meios liquidos vem o caldo de carne, cuja maneira de preparar vamos aprender :

Tomam-se 500 grammas de bôa carne de boi, pesada depois de desembaraçada da gordura e dos tendões ; corta-se em pequenos pedaços e bota-se a macerar em um litro d'agua durante 24 horas a frio, ou durante umas 5 horas sómente, se a temperatura ambiente não é muito baixa.

No fim de qualquer d'esses periodos de tempo espreme-se o todo atravez de um panno de linho bem limpo e previamente molhado. Se depois de espremido o caldo

não attingir as 500grammas. completa-se esse volume addicionando agua.

Em seguida leva-se o caldo ao fogo até a ebullição, tendo a cautella de agitar constantemente o liquido afim de que não pegue no fundo do vaso. Juntam se 10 grammas de peptona e 5 de sal marinho. Se o caldo está acido (o que se reconhece pelo papel de tournesol) neutralisa-se-o por meio de uma solução de soda á 1/10. ou por uma solução concentrada de bicarbonato de sodio.

Collocado o caldo em um pequeno caldeirão de ferro esmaltado, é levado ao autoclave, onde será aquecido a 120° e durante um quarto de hora. Filtra-se o liquido ainda quente e se reparte pelos diversos recipiantes previamente esterilisados.

Não devem ser esquecidas certas precauções que na pratica têm grande importancia. E' assim que durante a cocção deve-se agitar constantemente o liquido, porque a fibrina coagulando-se pode dar lugar a que o *caldo pegue* no fundo do caldeirão, segundo o termo usado pelos cosinheiros.

O filtro não pode deixar de ser molhado, afim de que a gordura não passe atravéz de suas paredes.

A escolha da peptona a ajuntar tem sua importancia. devendo-se usar sempre da mesma marca, porque a composição d'essas substancias varia com os fabricantes. No « Instituto Pasteur » usa-se da peptona Chapoteaut. Não é demais repetir que os microbios são exigentes na escolha de seus alimentos e que qualquer descuido pode ser causa de insucesso em uma cultura.

Como a peptona é acida, é preciso sempre alcalinisal-a com a soda, esterilisando-se (já se entende) previamente ambas as substancias.

Os phosphatos que o caldo contem são tanto *menos soluveis* quanto a temperatura é *mais alta* : elles se precipitam fazendo uma especie de colla no fundo do caldeirão.

E' depois que se forma este precipitado e quando a

temperatura tem attingido o gráo maximo desejado, que se deve filtrar o caldo para evitar que os phosphatos dissolvam-se novamente, quando o liquido esfriar.

Na auzencia do autoclave tambem se poderia conseguir a esterilisação do caldo em quatro ou cinco aquecimentos successivos ; e esse processo moroso e um tanto incerto, não deixará de ter a vantagem de evitar que, sob as altas temperaturas, a potassa actuando sobre as materias organicas mude um pouco a côr do liquido, que fica mais carregado : o que não deixa de ser um embaraço para bem observar-se a cultura mais tarde.

Tambem é de bôa pratica preparar-se de uma só vez uma grande porção de caldo : porque assim, na serie do estudos ou de experiencias que se tiver de fazer, tem-se a certeza de operar sempre sobre um meio identico a si mesmo, não havendo probabilidade de enganos provenientes da composição diversa dos differentes caldos, embora preparados segundo a mesma technica acima indicada.

E' cousa facil guardar e conservar uma grande quantidade de caldo. Em um matraz de 800 centimetros cubicos de capacidade, fechado á lampada e guardado ao abrigo da luz em um armario fechado, o caldo conserva-se indefinidamente.

Uma bucha de algodão coberta com papel poderá servir tambem para obturar o vaso ; mas o ar circulando atravez da trama de algodão produziria no liquido uma oxydação lenta não apreciavel pelos reagentes chimicos, mas revelada por certos microbios muito delicados e que não poderiam mais viver alli.

O microbio do carbunculo proliféra muito bem em um caldo recentemente preparado ; mas se o liquido tem soffrido a acção da luz durante duas ou tres horas, já as culturas quasi não se fazem ; e o do tetanos deixará tambem de cultivar-se em um caldo que tenha sido exposto ao ar, durante algum tempo.

Quando se quizer fechar os balões á lampada, é preciso

escolher vasos de fundo redondo: porque a forma espheroidal é que melhor resiste ás pressões: um matraz de fundo chato posto no autoclave e submettido a uma alta temperatura, quebrar se-á infallivelmente.

Raramente experimenta-se sobre tão grande porção de caldo, como a que os grandes balões contêm.

Ha varias especies de vasos de cultura; os mais simples, baratos e sobretudo os mais commodos são os tubos de ensaio.

O matraz «Pasteur» é de uma capacidade maior do que os tubos, pelo que presta-se a culturas mais extensas: alem d'isso é munido de uma rolha de vidro ouca, por onde o ar pode passar atravez de uma bucha de algodão, que enche o interior da rolha de vidro.

Para os microbios que precisam de uma maior quantidade de ar os vasos devem ter um amplo fundo chato, de maneira que o liquido possa offerecer uma larga superficie ao ar que por ahi circula.

Ha ainda balões possuindo de cada lado um tubo ou um braço curvo, por onde se pode forçar a passagem do ar ou de um gaz qualquer, para ficar em contacto com a cultura; qualquer, porem, que seja o fluido a empregar-se deve elle passar primeiramente atravez da agua para saturar-se de humidade e não apressar a evaporação do liquido nutritivo, especialmente se o balao tem de ir á estufa, como é a regra.

Uma precaução ainda é necessaria sempre que se tiver de aquecer os vasos de vidro com as respectivas buchas de algodão: vem a ser não levar-se o aquecimento alem 180.°, porque um pouco acima d'esta temperatura a materia organica começa a ser destruida e o algodão decompondo-se dá nascimento a productos antisepticos, que se cahirem no interior do vaso, podem matar as culturas.

E' por intermedio do matraz-pipetta ou matraz-distribuidor que se faz o transvasamento do liquido contido nos grandes balões para os vasos menores e para os tubos.

Uma vez retirada a quantidade de liquido que se quer, fecha-se de novo o balão á lampada e colloca-se em logar escuro.

— Como se deve semear o caldo ?

— Por meio de um fio de platina, que foi anteriormente esterilisado até o vermelho-rubro em uma chamma de gaz ou de alcool, recolhe-se um pouco da semente, mergulhando simplesmente a platina no liquido de onde vem a semente, ou raspando levemente uma particula da substancia, se ella é solida.

Em seguida mergulha-se a platina no caldo que tem de receber a semente, agitando-a um pouco e fechando immediatamente o tubo com algodão ; tudo porem sem tocar com os dedos na abertura do mesmo tubo. Levadas as culturas á estufa de incubação, no fim de algumas horas já o liquido está se turvando, signal evidente de que tem principiado a proliferação dos microbios: então é muito facil seguir e observar todas as phases da operação.

O *bacillus subtilis* precisa de 8 a 10 dias para desenvolver-se no caldo, e quando o faz deixa cahir no fundo do tubo pequenas espheras. O *bacillus micoyde* deixa o liquido perfeitamente claro, mas deixa ver no fundo do tubo flocos alvos e densos.

Um *streptococcus* dará pequenos novelos, que se dispõem ao longo das paredes do vidro. O *bacillo de Kiel* desenvolve-se na superficie do liquido e a sua materia corante dissemina-se por toda a massa, tingindo-a com a côr vermelha propria d'aquelle organismo. A bacteria do carbunculo dá um grande floco, que fluctua no meio do liquido transparente.

O *farcino do boi* dá umas escamas que sobrenadam na cultura. Emfim os microbios apresentam-se no caldo sob um aspecto particular, que muito facilita o diagnostico.

Convem entretanto lembrar que a idade das culturas e a natureza do meio modificam o seu aspecto, sendo indis-

pensavel, para bem distinguil-as á simples inspecção, um grande habito de observar taes culturas.

Nem todos os caldos são identicos : o gráo de acidez do liquido pode variar, se a carne de onde proveio continha maior ou menor quantidade de acido lactico ; por isso todo caldo deve ser ensaiado previamente, acidificando-se-o, neutralisando-o, ou ainda alcalisando-o. conforme a preferencia dos microbios por qualquer d'esses estados.

Na carne encontram-se os elementos indispensaveis á vida dos seres organisados : phosphoro, enxofre, cal. magnesia, materias hydro-carbonadas. substancias azotadas. etc.

Algumas vezes os microbios transformam a materia azotada em ammoniaco : n'este caso a cultura torna-se alcalina e teremos phosphatos ammoniaco-magnesianos e ammoniacos compostos. Muitas vezes tambem os microbios fabricam productos analogos ás diastases ; e são estes os mais interessantes debaixo do ponto de vista bio-chimico.

Em logar da carne de vacca pode-se empregar a de qualquer outro animal. usado ou não, para alimentação do homem. Da mesma maneira todos os orgãos do animal : figado, baço, pulmões, etc., podem servir para a fabricação dos caldos de cultura.

Tambem as materias vegetaes poderão servir para o mesmo fim. O malt ou centeio germinado fornece um excellente meio : 10 grammas de malt pilado para 100 grammas d'agua. que se aquece de 55° a 58° durante uma hora, afim de que se faça a saccharificação e haja maltose, dextrina, etc., constituem um meio de predilecção dos fermentos, cogumelos. tinhas. etc.

Comtudo esses liquidos organicos não poderão servir para a analyse rigorosa das propriedades bio-chimicas de um microbio. Para tal fim são necessarios outros liquidos contendo materias fixas e exactamente dosadas ; pelas decomposições operadas e pelo calculo das quantidades restantes dos principios mineraes contidos em um *liquido teste-*

munha, ter-se-á com precisão mathematica uma analyse quantitativa.

Foi com este intuito que Pasteur organisou a seguinte solução :

Agua................................	100	grammas
Assucar candi.......................	10	»
Carb. de ammoniaco........	1	gramma
Cinzas de levêdo..........	1	»

Este liquido era destinado a uma cultura do levêdo de cerveja. O assucar candi é um corpo perfeitamente determinado ; o carbonato de ammoniaco é um alimento azotado, onde os microbios vão buscar o azoto de que precisam ; nas cinzas encontrarão elles os phosphatos e as materias mineraes, igualmente indispensaveis á vida. Foi com o auxillo d'este reactivo que Pasteur assentou as bases da sua theoria das fermentações.

O grande chimico allemão Liebig ensinava que a fermentação era produzida pela addição de um corpo chamado *fermento* a uma materia fermentavel. As cellulas eram animadas de um movimento particular, que transmittindo-se ao corpo fermentavel o deslocavam, decompondo-o ou alterando-o : ellas praticavam, segundo Liebig, uma destruição : operavam uma obra de morte.

Pasteur provou, que pelo contrario, ellas faziam obra de vida. E para demonstral-o tomava o seu licor mineral e punha-o em contacto com uma *unica* cellula viva de levêdo ; ao mesmo tempo que a fermentação se fazia, Pasteur obtinha uma geração inteira de cellulas vivas. Fundou se assim solidamente a grande theoria da fermentação, que em ultima analyse é a mesma das molestias infecciosas.

Raulin procurando um meio que fosse superior a todos os liquidos naturaes para a cultura do *aspergillus niger*, imaginou a seguinte composição :

Agua.....	1,500	grammas
Assucar candi	70	»

Acido tartrico..	4	grammas
Nitrato de ammoniaco..........	4	»
Phosphato de ammoniaco	0,60	»
Carbonato de potassa.	0,40	»
Sulfato de ammoniaco........ .	0.25	»
Sulfato de zinco...........	0,07	»
Sulfato de ferro..	0.07	»
Silicato de potassa..................	0,07	»

O acido tartrico é destinado a acidificar o meio, porque como é sabido, os bolores gostam dos acidos, e n'este liquido o aspergi'lo negro dá a mais bella cultura.

Fazendo-se variar a composição do liquido em qualquer direcção, suprimindo-se, por exemplo, um dos elementos, obtem-se uma diminuição de peso na colheita de mofo.

O ferro não é absorvido; mas a planta crescendo produz um sulfo-cyannreto de potassio, que impederia o seu desenvolvimento se não fosse o sulfato de ferro, que se combinando com aquelle sal remove tão grande inconveniente.

Estas experiencias e estudos levaram o author a abrir uma nova via á agricultura, mostrando a influencia da natureza do solo e dos diversos adubos.

Tambem Conh propoz o liquido abaixo:

Agua distillada...........	200	grammas
Tartrato de ammoniaco...........	2	»
Phosphato de potassa............	2	»
Sulfato de magnesio..............	1	gramma
Phosphato-tribasico de cal.........	0,1	»

Se os meios solidos apresentam uma grande vantagem para o estudo extemporaneo dos microbios, os liquidos lhes são bem superiores quando se quer fazer longas pesquizas.

Com effeito quaesquer que sejam as precauções que se tomem, não se poderia impedir a deseccação no fim de um tempo mais ou menos longo e, por consequencia, a morte da cultura.

Os caldos, pelo contrario, podem se conservar indefinidamente, tendo-se ainda a vantagem de operar sobre um meio identico, na longa serie de experiencias a fazer; o que não succederia com os solidos que estão sugeitos a variações que compromettem os resultados, os quaes nunca podem ser comparados entre si.

GELATINA E GELOSE

SUMMARIO— Preparação da gelatina nutritiva.—Maceração.— Filtração.— Repartição pelos vasos de cultura. — Esterilisação. — Tubos rectos. — Tubos inclinados.—Isolamento das especies.— Sementeiras por picadas. — Caracteres das culturas.—Liquefacção da gelatina.—Meios solidos transparentes.— Gelose ou agar-agar.—Gelose nutritiva, sua preparação. — Os microbios não liquefazem a gelose. Geléa de lichen.—Gelose-gelatina.

Um meio liquido addicionado de gelatina quando se resfria adhere ao vaso; este meio nutritivo foi introduzido na technica bacteriologica por Koch.

A gelatina é um producto da dilatação da osseina que se obtem tratando-se pelo vapor d'agua á alta temperatura, ossos descalcificados pelo acido chlorhydrico.

Depois d'esta simples manipulação a gelatina ainda é impura : é preciso laval-a sob um filete d'agua que remove as impurezas ; depois dissolve-se-a em agua fervendo e recolhe-se o producto em alcool, que a precipita. Recomeça-se esta operacão duas, trez ou quatro vezes, até obter-se uma gelatina pura.

Nos laboratorios, para obter-se a gelatina nutritiva. usa-se do seguinte processo: faz-se macerar durante cinco ou seis horas 500 grammas de carne de vacca em um litro d'agua; espreme-se em um panno, juntam-se ao succo obtido 100 grammas de gelatina extra-branca e 5 grammas de sal marinho: aquece-se ao banho-maria até 60 gráos para dissolver a gelatina: alcalinisa-se ligeiramente com a soda e leva-se de novo ao banho-maria, durante uma hora e a 100 gráos de temperatura. Se a coagulação não se fizer bem e se o liquido não ficar claro, deixa-se esfriar até 55° e junta-se a clara de um ovo diluida em 50 centimetros cubicos d'agua; mexe-se o todo e aquece-se de novo a 100°. Feito isso filtra-se a quente e reparte-se pelos tubos de cultura, tendo-se o cuidado de não sujar o orificio d'estes. Esterilisa-se finalmente aquecendo a 100° durante trez dias successivos.

Dissolvendo a gelatina a 60° tem-se por fim não fazer coagular as materias albuminoides: pelo mesmo motivo, durante a cocção, é preciso agitar constantemente toda a massa liquida. Junta-se a soda no fim da fusão para obter-se uma alcalinisação definida: mas não deve excedel-a porque a gelatina se modificaria, produzindo-se glycocolla, que não coalharia nem se apegaria ao vaso; phenomeno este indispensavel para o fim que se tem em vista usando da gelatina como meio de cultura.

Emfim elevando-se a temperatura a 100° consegue-se a coagulação das materias albuminoides, que se precipitam, aprisionando nas malhas de sua rede os saes terrosos e os restos de fibras musculares, deixando o liquido limpido.

Apezar d'isso nem sempre o liquido é inteiramente claro; é por isso que junta-se a clara d'ovo. E' evidente que para fazel-o deve-se deixar o liquido esfriar até um ponto em que a albumina não se coagule antes de ter-se espalhado por toda a massa; coagulação que se dará mais tarde aquecendo-se de novo o liquido; n'essa

occasião as impurezas restantes serão detidas pela albumina coagulada em todos os pontos.

Quando a temperatura é muito baixa, é preciso fazer-se a filtração a quente, em um funil especial, que permitte fazer a operação ao abrigo do ar ambiente. Obtida a filtração reparte-se o liquido pelos vasos de cultura, previamente esterilisados. Como não pode-se aquecer a gelatina a 115°, visto ella não solidificar-se mais, só pode-se conseguir matar os germens n'ella contidos, por meio do aquecimento descontinuo, que faz-se a 100° e em tres dias consecutivos. Preparam-se muitos tubos ao mesmo tempo com porções variaveis do liquido, contendo de 1 a 3 centimetros cubicos.

D'estes tubos uns são collocados verticalmente, e outros são inclinados quasi em plano horisontal para ter-se uma superficie mais vasta.

Sobre a gelatina podem ser cultivados os germens ou os esporos. Nos meios liquidos faz-se, como já vimos, uma separação dos microbios por diluição ; sobre batatas é difficil reconhecer-se os microbios não coloridos ; alem d'isso os processos são longos ; em gelatina, porem, semeando-se antes do endurecimento da massa os germens ficam espalhados por todos os pontos do liquido ; e quando este coagula-se elles ficam presos, formando colonias bem distinctas, que podem ser estudadas através das paredes transparentes do tubo.

Semea-se a gelatina quando solidificada, por meio de *estrias* ou de *picada* ; n'este ultimo caso a agulha de platina levando a semente é introduzida verticalmente no eixo da massa, até muito profundamente. Para as *estrias* servem os tubos em que a gelatina resfriou e adherio estando o vidro muito inclinado. Risca-se com a platina a superficie livre da substancia a semear, fazendo-se um traço mais ou menos sinuoso ; parallelamente a este podem-se fazer outros traços. Está entendido que todas essas manipulações exigem grande cuidado para evitar-se

o contagio, que, ao menor descuido, pode attingir o operador : este corre grande perigo manejando germens virulentissimos que podem dar a morte.

No fim de poucos dias apparecem as colonias de microbios.

Alguns d'elles liquefazem a gelatina : quando isso tem logar forma-se na parte superior da picada uma capsula, com a forma de um funil ; o phenomeno é devido á decomposição do meio, em presença da diastase secretada pelos germens, e serve para caracterisar certas especies de microbios, os quaes podem dividir-se em dous grandes grupos : microbios que liquefazem a gelatina e microbios que não a alteram.

Ao lado de vantagens reaes tem a gelatina um grande inconveniente ; visto como muito difficil é o seu emprego nos paizes quentes ; a 23° ella funde-se.

De outro lado, na immensa maioria dos casos a cultura das especies pathogenicas (justamente as que mais nos interessam) precisa soffrer a incubação na estufa, com uma temperatura variando de 35 a 48 gráos. Claro está que n'estas condições não se deve pensar em tal producto para as culturas.

Um *substratum* possuindo todas as vantagens da gelatina sem os inconvenientes d'esta, encontrou-se na *gelose* (como é conhecido em França), ou *agar-agar*, como o denominam os allemães, ou simplesmente agar, como o uso irá abreviando.

A gelose ou agar é um producto colloide, isomero da cellulose e que foi estudado pela primeira vez por Payen, que o extraio de certas algas, dando-lhe o nome de gelose, quando em 1859 apresentou á Academia de Sciencias de Pariz os seus trabalhos sobre o assumpto.

O agar usado nos laboratorios vem geralmente de uma alga do mar das Indias, o—*Gelidium spiriforme*, da ordem *Florideas.*

E' esta especie que fornece em abundancia a droga conhecida no commercio por agar-agar, ou ainda pelo nome de *vareck corné*, como tambem chamam na França.

Prepara-se a geléa nutritiva de agar, fazendo-se macerar durante algumas horas 500 grammas de carne muscular bem picada, em um litro d'agua ; depois espreme-se e juntam-se 10 grammas de peptona e 5 ditas de sal marinho (tudo como para a gelatina), leva-se á ebulição, filtra-se e alcalinisa-se francamente com a soda.

Divide-se em seguida 15 grammas de agar em pequenos pedaços e junta-se ao liquido. que de novo vai até a completa fusão ou dissolução do agar, agitando-se sempre a massa que é depois aquecida a 120°, durante 25 minutos.

E' indispensavel elevar o aquecimento áquella temperatura, assim como alcalinisar francamente, se se quizer obter um liquido claro e transparente.

Uma vez obtida uma reacção alcalina bem accentuada filtra-se o liquido sobre papel Chardrin e reparte-se ainda a quente pelos varios tubos, pelo mesmo processo que já indicamos para a gelatina.

Não é demais insistir sobre a alcalinisação da gelose, que precisa ser bem nitida, do contrario, sob a influencia do calôr, os acidos mesmo fracos a transformarão rapidamente em assucar analogo á galactose, alterando profundamente o meio nutritivo.

Quando quente é a gelose limpida, mas resfriando-se ella o é menos, deixando entretanto ver bem as culturas. No fundo dos tubos fica sempre uma pequena porção d'agua que impede a adhesão do *substratum* ás paredes do vaso, de sorte que a massa foge sob a agulha quando se tem de semear ; mas levando-se os tubos uma segunda vez á estufa remove-se este embaraço e a gelose seccando um pouco pela peripheria, os bordos da massa adherem afinal ao vidro.

Sendo uma substancia de natureza celluloide o agar-

agar não offerece um alimento para os microbios, e de ordinario não é atacado por elles : serve apenas de supporte ás culturas.

Para semear-se a gelose segue-se a mesma technica que já conhecemos para a gelatina. As culturas, embora um pouco menos pronunciadas, offerecem todavia os mesmos aspectos que sobre a gelatina ; não dando-se entretanto a liquefacção, nos casos em que esta tem lugar n'aquelle outro meio.

Outras algas visinhas d'aquellas que fornecem o agar, podem dar uma substancia analoga, servindo para os mesmos fins.

E' assim que Miquel, o conhecido director do observatorio meteorologico do Parque Mont-souris, prepara uma geléa nutritiva com productos de uma planta marinha — o *Chondrus crispus*, familia das *Gigartinadas*, ordem das *Florideas*, que encontra-se desde os Açores até as costas da Noruega.

E' esta planta que fornece os elementos para a preparação dos productos conhecidos no commercio por geléa de *Carraghaen* ou de musgo da Irlanda. Miquel toma 300 grammas do lichen e ferve durante uma hora em 10 litros d'agua. Obtida a dissolução côa-se o liquido, que tem uma côr cinzenta clara ; leva-se de novo ao fogo, durante muitas horas, filtra-se a quente, evapora-se e obtem-se então bolos solidos e seccos da alga. Quando se quer preparar um caldo com esta substancia é na proporção de *um* gramma para *cem* partes do succo de carne e a gelose obtida só liquefaz-se a 60 gráos.

Em vez de caldo, poderemos nos servir de uma solução de peptona no preparo da gelose. O extracto de carne de Liebig serve para o mesmo fim, e é justamente n'este ultimo meio que o bacillo do carbunculo dá bellos esporos.

Tambem pode-se combinar em porporções diversas a gelatina com a gelose, obtendo-se meios nutritivos participando das vantagens de ambas as substancias isoladas.

O ponto de fusão passa a ser mais elevado : de 30 a 35 gráos, o que incontestavelmente é de uma grande vantagem.

A combinação é tambem excellente para fazer-se o isolamento das especies. Obtem-se o agar gelatinado ou a gelose-gelatina preparando se a gelatina pelo processo ordinario, já descripto, e depois de bem alcalinisado junta-se 1/2 por cento de agar.

O aquecimento pode ser elevado a 120°, porque não ha receio de que o meio deixe de solidificar-se ; por isso que a presença da alga remove aquelle inconveniente da gelatina pura.

Nestas condições é inutil esterilisar previamente os tubos, cujo conteudo supporta sem inconveniente aquella temperatura ; e por isso a esterilisação faz-se em um só tempo.

FILTRAÇÃO

SUMMARIO — Esterilisação dos meios que não podem ser aquecidos. — Liquidos contendo albumina. — Esterilisação por filtração.—Filtros de Pasteur e Joubert. —Filtros de terra cotta.— Tubos filtrantes.— Filtro Chamberland.— Maneira de recolher e repartir os liquidos. — Modificações operadas no liquido pela filtração.—Filtração sob pressão de acido carbonico. — Preparação do serum de sangue. —Sua esterilisação.—Liquidos organicos naturalmente estereis.— Liquidos da ascite, do hydrocele, do amnios.—Urina. — Albumina do ovo. — Cultura nos ovos. — Humor aquoso.

Ja vimos que o melhor processo de esterilisação é o aquecimento a 115° no autoclave ; mas já vimos tambem que nem todos os meios supportam uma temperatura elevada sem perder as suas qualidades nutritivas. Entretanto nas experiencias e estudos de laboratorio ha necessidade de encontrar-se meios analogos aos que certos microbios pathogenicos encontram no organismo humano.

Nos meios organicos, como por exemplo, na infusão

de *malt*, a maltose altera-se pelo calôr alto : do mesmo modo, as substancias assucaradas crystallisaveis, a uréa e outras decompõem-se a uma temperatura elevada.

Assim, foi preciso procurar-se um outro processo de esterilisação e pensou-se na filtração.

Os microbios, se bem que infinitamente pequenos. porque alguns d'elles attingem apenas a um milesimo de millimetro de comprimento. são comtudo corpos solidos, pelo que imaginou-se que podiam ser filtrados.

Pasteur e Joubert inventaram um filtro de gesso assim constituido : em um tubo de forma especial elles introduziram um tampão de algodão e em seguida um tubo de gesso. que por sua vez era coberto de algodão : o apparelho era introduzido em um balão. munido de uma tubuladura lateral que permittia a aspiração ; do outro lado do balão havia uma segunda tubuladura afilada e fechada á lampada. servindo mais tarde para a distribuição do liquido filtrado. Todo o apparelho era cuidadosamente esterilisado.

Pasteur construio esse apparelho para demonstrar que em uma cultura só os corpos solidos eram pathogenicos, ao passo que o liquido era inoffensivo. Effectivamente elle podia injectar nas veias de um cão uma grande quantidade de cultura de carbunculo filtrada sem que o animal désse a menor demonstração de parecer doente ; entretanto alguns corpusculos recolhidos sobre o filtro matavam o cão rapidamente. Ficou tambem demonstrada a efficacia d'esse novo processo de esterilisação. A espessura do filtro não tinha maior importancia : alguns centimetros bastavam, mas o gesso tinha certos inconvenientes e não pequenos : alem de não ser aquelle corpo insoluvel e o sulfato de cal dissolvido produzir alterações nocivas no liquido, succedia que a dissolução podia deixar lacunas nas paredes do filtro, abrindo assim uma porta á passagem dos microbios. Demais os filtros de gesso só podiam servir para pequenas quantidades de liquido e estragavam-se rapida-

mente, sendo preciso desmanchal-os e moldal-os de novo, após cada operação.

Procurou-se melhorar o filtro juntando o gesso ao amiantho; mas pouco se adiantou: pelo que ensaiou-se utilisar na construcção d'aquelles apparelhos, a terra de faienças ou barro de *Choisy le Roi*, fabricando-se cylindros oucos da grossura de um lapis, que eram montados em tubos esterilisados, ou em balões, com o auxilio de diversos dispositivos: os lapis eram soldados com cêra Gollaz, e quando tinha-se de limpar o filtro, era preciso fundir a cêra polo calor. Por meio de diversos artificios conseguia se filtar de dentro para fóra e vice-versa; mas posto que esse filtro representasse um progresso, não podia servir para a filtração em grande escala.

Chamberland, um dos discipulos mais aproveitaveis da escola pastoriana, introduzio algumas modificações no filtro, e augmentando o calibre dos tubos dotou os laboratorios com o bom filtro que leva o seu nome, filtro que rapidamente entrou nos usos domesticos, em escala vastissima.

E não ha duvida que o filtro Chamberland é um bom apparelho, com a condição, porém, de serem tomadas certas precauções antes de usal-o, afim de que não fiquem annulladas as suas propriedades esterilisantes.

E' assim que antes do seu emprego devem as vélas ser aquecidas a 115° e ensaiadas, para ter-se a certeza de que não ha em suas paredes qualquer lacuna ou falha, principalmente porque filtra-se ordinariamente sob uma pressão de trez a quatro atmospheras. O ensaio é muito simples: liga-se o filtro a um folle, como esses de borracha usados nos pulverisadores de toilette e mergulha-se a véla em agua: fazendo-se actuar o folle com uma certa pressão, si sahirem bolhas finissimas de ar é que existe qualquer falha ou rachadura, devendo por isso a véla ser regeitada por imprestavel. Esta prova, bem como a esterilisação

prévia no autoclave, são indispensaveis; e inutil é usar-se de um filtro que não foi assim tratado.

Examinando-se ao microscopio um córte da parede de uma véla Chamberland, como se examina um córte histologico de um osso, vê-se que os póros são muito maiores do que as dimensões dos microbios. E porque então estes organismos não atravessam aquelles buracos? E' que dá-se dá ahi um phenomeno de capillaridade, onde só os liquidos passam, emquanto que os microbios ficam detidos na parede externa da véla.

Chega um momento em que os microbios accumulam-se em tão grande quantidade que o liquido não passa mais: diz-se então que o tubo *colmata-se*; n'este caso é preciso desembaraçar as suas paredes exteriores d'essa camada de impurezas e esterilisar de novo o filtro; mas desta vez, a 180º para que tenha logar a destruição da materia organica e a desaggregação seja completa.

Assim tratados são entretanto excellentes os filtros Chamberland; mas se os deixarmos por muito tempo expostos á humidade sem os limpar, sobretudo em tempo de calôr, os mofos vegetando sobre as paredes do tubo, insinuarão os seus filamentos atravez dos póros, deixando cahir as sementes ou esporos no liquido a filtrar. E' por isso que deve-se recorrer com frequencia a esterilisação dos filtros.

O Dr. d'Arsonval recommenda que se faça a filtração sob fortes pressões, obtidas pelo acido carbonico, que por si mesmo ja é um parasiticida, anniquilando perfeitamente as formas vegetativas da maior parte dos germens, não tendo, porém, a menor acção sobre os esporos. A alta pressão que o apparelho de d'Arsonval desenvolve tem a sua utilidade: os liquidos albuminosos que difficilmente passariam sem pressão, a ella submettidos, passam depressa; isto bem entendido, no começo, porque com a continuação o apparelho colmata-se como todo e qualquer outro; até mesmo um pouco mais cedo por causa da grande

velocidade com que o liquido vai passando no principio da operação. Ha outro inconveniente ainda no apparelho de d'Arsonval: o acido carbonico, cuja acção é quasi nulla quando o gaz está no estado livre, toma, submettido á pressão, propriedades novas e vai alterar as toxinas que ficam muito enfraquecidas. Até mesmo as substancias crystallisadas alteram-se algumas vezes.

A filtração a quente, proposta por Miquel, tem o mesmo inconveniente: a operação faz-se bem no começo, para suspender-se logo depois com a colmatação do filtro.

Quando não se consegue esterilisar um liquido pela filtração é o caso de recorrer se ao aquecimento discontinuo, de que ja fallamos em outra parte.

Liquidos ha muito ricos em albumina, como o serum, cuja esterilisação deve ser feita em 8 ou 10 dias successivos e a 58º de temperatura; operação que só pode ser bem executada em um apparelho perfeitamente regulado e munido de um banho-maria.

O serum deve ser tão puro quanto possivel, devendo ser recolhido com todas as precauções imaginaveis nos matadouros ou em outro qualquer lugar que o possa fornecer em boas condições de pureza.

Depois de um repouso de 24 a 48 horas repartir-se-á o serum pelos tubos ou balões de ante-mão esterilisados; em seguida esses vasos serão aquecidos a 58º, como já foi dito.

O serum emprega-se liquido e sem addição de qualquer outra substancia (então não é elle um bom meio de cultura), ou misturado com caldo. Algumas vezes usa-se d'elle solido, coagulando-se-o na estufa: não se deve, porém, preparar grandes quantidades de serum de uma só vez, porque este producto oxydando-se, altera-se.

Os liquidos do organismo, pathologicos ou não, e destituidos de microbios, fornecem excellentes meios de cultura. Se são puros esses liquidos nunca se alteram, ou quando muito as alterações são de ordem puramente chimicas e nunca de origem microbiana.

Outr'ora acreditava-se que o sangue não continha microbios; por uma serie de experiencias demonstrou-se porem que assim não é: no momento da digestão os microbios passam do intestino para o chylo e d'este para o sangue; felizmente ahi elles encontram cellulas especiaes ditas *phagocytas* que os absorvem, digerindo-os tão bem que algumas horas depois da nossa digestão o sangue é absolutamente puro. De sorte que pode-se formular esta proposição: «quanto mais distante da digestão, mais puro é o sangue» (Dr. Roux).

Como colher-se sangue com pureza? — Nos pequenos animaes é esta uma operação delicadissima: ao passo que nas grandes especies a cousa não é difficil. Não ha necessidade de insistirmos mais sobre detalhes que garantam uma antisepsia completa, a qual domina qualquer technica em bacteriologia. Reconhecida a veia ou a arteria que se quer abrir, raspados os pellos, lavada a parte com uma solução de sublimado, ou mesmo queimado a pelle com um ferro em braza (processo um tanto deshumano) faz-se penetrar o trocate, recolhendo-se o sangue em um bocal muito limpo e esterilisado.

Ha um meio muito simples de desfibrinar o sangue: collocam-se umas pequenas espheras de vidro dentro do vaso, que depois de cheio é agitado de maneira a que as bolas movam-se tambem; a fibrina adhere as espheras, ao passo que o resto do contendo do vaso conserva-se fluido.

Pode-se juntar serum e caldo, serum e gelose, variar emfim as misturas. Para cultivar-se o microbio da *influenza*, que só dá em uma mistura de sangue e gelose, liquefaz-se a gelose a 80°, deixa-se esfriar até 38° e encorpora-se o agar ao sangue n'esta ultima temperatura, para que não se dê a coagulação da albumina. O *gonococo* prefere, como terreno de cultura, uma mistura de agar, serum e caldo.

Outros liquidos do organismo, physiologicos ou pathologicos, convêm igualmente á cultura das bacterias. Obtem-

se soberba proliferação do microbio da erysipela, cultivando-o no liquido da ascite misturado ao caldo.

O liquido da pleuresia, o da hydrocele, o amnios, a urina recolhida com uma sonda esterilisada, o humor aquoso, prestam se muito bem para as culturas.

Os ovos conservam-se perfeitos durante muito tempo, com a condição de serem guardados em local secco, para evitar-se que o mofo invada-os exatamente como se dá com as vélas dos filtros. Pode-se semear um ovo directamente, esterilisando a grossa extremidade á chamma; quebra-se então uma pequena parcella da casca e semea-se com o fio de platina, como se fosse um tubo; em seguida fecha-se a abertura com lacre e leva-se o ovo á estufa. Tem-se assim ao mesmo tempo o vaso e o liquido de cultura, a qual faz-se muito bem, o que se conhece por certos signaes exteriores, como sejam : a lividez do ovo, a albumina que se liquefaz, a gemma que enegrece ; é uma cultura quasi anaerobia.

E' preciso notar que a albumina de todos os ovos não é a mesma ; o ovo de pato, por exemplo, differe do da gallinha na maneira de reagir sobre os microbios.

Pode-se ainda, com uma pipetta, tirar um pouco da clara para qualquer vaso de cultura, podendo-se tambem misturar com outras substancias.

As mais bellas bacteridias do carbunculo obtêm-se no humor aquoso do olho ; foi n'este meio que Koch fez os seus importantes estudos sobre aquelle germen. O humor aquoso pode ser retirado do olho dos animaes vivos ou mortos, introduzindo-se uma pipetta no globo ocular do animal. O liquido sobe por capillaridade e fecha-se depois a pipetta á lampada.

SEPARAÇÃO DOS MICROBIOS

SUMMARIO — Vantagens da gelatina; culturas sobre placas; sua esterilisação. — Diluição da semente. — Maneira de estender-se a gelatina sobre as placas. — Bocetas de Petri. — Tubos de Esmarch. — Aspectos das colonias. — Colonias liquefazendo a gelatina. — Exame microscopico. — Variações no aspecto das colonias do mesmo microbio. — Estructura das colonias. — Inconvenientes da gelatina. — Placas de gelose. — Gelose gelatinada. — cultura sobre *porta objecto.* — Cultura em cellulas — Repicagem. — Contagem das colonias. — CULTURA DOS ANAEROBIOS.

Não basta fazer-se a cultura de microbios em um meio puro para estudar-se a vida d'esses micro-organismos: é preciso ainda isolal-os; mas esta operação é muito delicada e constitue um dos pontos mais importantes da technica bacteriologica.

Começa-se por liquefazer um tubo de gelatina e collocal-o em um banho-maria, ou simplesmente aquecel-o ao calor da mão. Semêa-se uma pequena quantidade de uma mistura microbiana, de maneira que a gotta

introduzida espalhe-se o melhor e o mais possivel por toda a massa de gelatina ; depois derrama-se esta sobre placas de vidro. Logo que a gelatina esfria, coagula-se aprisionando em certos pontos os microbios esparsos, que mais tarde se desenvolvem em colonias, com o seu aspecto caracteristico.

Se as colonias forem muito numerosas (o que succederá se o liquido que forneceu a semente for muito rico em microbios) ellas se prejudicarão mutuamente : as especies que liquefazem a gelatina impedirão que as suas visinhas prosperem, roubando-lhes o terreno nutritivo.

Este inconveniente é evitado desde que se fizer uso somente de tubos em terceira e quarta diluição, porque os germens sendo nos ultimos tubos relativamente raros, as colonias se formarão á distancias convenientes uma das outras.

Feitas estas manipulações é preciso esperar que a gelatina esfrie até 30 gráos, ponto em que ella é ainda bem liquida e permitte todas as operações de cultura, sem que os germens morram.

As placas de vidro são ordinariamente rectangulares, tendo uns doze centimetros de comprimento sobre nove de largura. Dispõe-se a placa ou placas em bandeijas de folha de Flandres, esterilisando-as em seguida a 180°. Deve-se deixal-as arrefecer mesmo no forno para que não se quebrem com a mudança brusca de temperatura. E' preciso tambem segurar as placas com uma pinça esterilisada, ou pelo menos não tocarmos com os nossos dêdos nos pontos em que tem-se de derramar a gelatina.

Estas placas devem estar collocadas em um plano rigorosamente horizontal, no momento de receber em o liquido ; este deve, quando coagulado formar uma camada de igual espessura e tão delgada quanto possivel.

Varios apparelhos usados nos laboratorios garantem uma horisontalidade perfeita das placas e operam o resfriamento rapido da gelatina. A citar entre outros o de Koch, munido de um parafuso, que subindo, ou descendo,

estabelece o nivellamento procurado; mas este apparelho. composto de varios crystallisadores, está abandonado: não somente por causa de sua fragilidade e complicação, como tambem por que traziam alguma morosidade nas manipulações.

Actualmente o apparelho empregado é o do professor Roux. E' elle constituido por um tambor ou caixa metallica, munida de um parafuso para dar a horisontalidade perfeita, por movimento de subida ou descida; horisontalidade verificada com precisão no nivel de bolha de ar que existe no proprio apparelho; este ainda é disposto de maneira que pelo interior da caixa passe uma corrente de agua fria, cuja temperatura pode ser abaixada artificialmente, ou por meio do gelo, ou por qualquer mistura refrigerante, collocada dentro do tambor Este apparelho simples, solido e até elegante, produz a solidificação das placas de gelatina collocadas na sua superficie superior, quasi que instantaneamente. Uma campanula de vidro abriga as placas, cobrindo-as.

Para que as culturas se desenvolvam é preciso que a gelatina não fique muito secca; pelo que collocam se as placas em *camara humida*, a qual é constituida por dous crystallisadores, servindo um delles de tampa ou cobertura do outro: o crystallisador inferior é guarnecido de papel mata-borrão imbebido em uma solução de sublimado; no interior dos vasos ha uns supportes de vidro formando pratileiras; cada uma d'estas é forrada por uma tira de papel *buvard* para evitar que as placas escorreguem. As placas são collocadas nas pratileiras, de modo que as mais carregadas de germens fiquem nos andares inferiores.

Para diminuir as probabilidades de contaminação das culturas, todas as vezes que se quizer examinal-as e portanto expol-as ao ar ambiente, Petri imaginou as caixas de vidro, ditas *bocetas de Petri*, muito parecidas com as caixas de rapé pelo seu formato e tamanho, que é apenas um pouco maior, prestando-se admiravelmente bem ás cul-

turas em placas e ao exame ulterior no microscopio, sem haver necessidade de expor as culturas á contaminação do ar exterior.

Taes placas (as unicas usadas hoje) são formadas de dous discos de vidro, com bordos pouco elevados, como dous pequenos crystalisadores, um d'elles de maior diametro do que o outro de modo a cobril-o completamente.

Depois de esterilisados pelo processo já tantas vezes indicado n'este trabalho, despeja-se no disco de menor diametro o conteudo de um tubo de gelatina liquida e já semeada, exactamente como se faz com as placas ; tampa-se com o outro disco e quando as colonias se desenvolvem, ou estão em via do desenvolvimento, pode-se atravéz do vidro. examinar o que se vai passando no interior da caixa, que tambem pode ser collocada na platina do microscopio para ser estudada a cultura.

Os tubos chamados de Esmarch tambem prestam-se á separação dos microbios. Escolhem-se tubos contendo apenas um centimetro cubico de gelatina, que se liquefaz e semêa-se ; depois procura-se espalhar a gelatina pelas paredes do vaso, o que se consegue collocando o tubo horisontalmente e imprimindo-lhe entre os dedos um movimento uniforme de rotação, mas isto sob um fio d'agua corrente bem fria, afim de que a gelatina solidifique-se rapidamente ne modo a formar interiormente uma camada bem delgada e da mesma espessura em todos os pontos : d'este modo as colonias podem ser bem examinadas aquelles tubos.

Entretanto hoje toda gente usa de preferencia das bocetas de Petri, que são muito mais praticas ; e salvo o desejo de complicar propositalmente a technica da separação, ninguem mais procura fazer culturas nos tubos de Esmarch.

Quer seja em placas, caixas, ou tubos, apparecem logo nos meios gelatinosos pontos brilhantes que examinados

atravez de uma lente apresentam varios aspectos: uns estão na superficie, outros nas camadas mais profundas do *substratum*: uns crescem rapidamente, outros vão mais de vagar. Examinada a cultura ao microscopio, com um augmento de 200, 600, ou 800 diametros, patenteiam-se os seus diversos caractéres, como os de coloração, que pode ser branca, amarella, encarnada, parda, etc.; observar-se-á se existe uma pellicula, se os contornos são regulares, ou se pelo contrario são sinuosos ou recortados; se as superficies são lisas ou estriadas; opacas ou transparentes; se ha pontos que se liquefazem rapidamente, ao contrario de outros onde este processo faz-se de modo lento; notar-se-á ainda se o aspecto é turvo ou transparente, indicando no primeiro caso, a presença de microbios dotados de mobilidade. Os germens tendo a forma bacillar ou filamentosa darão prolongamentos partindo do ponto de adherencia da colonia, como a bacteridia do carbunculo, entre outros.

Estas cousas passam-se nas condições normaes, mas segundo as circunstancias todo pode variar. Assim por exemplo, se a gelatina fôr preparada com 15 % d'esta materia em vez de 10, a liquefação será retardada; isto quer dizer que só se podem fazer comparações quando as condições forem identicas.

Os bacillos *typhico* e *côli* apresentam colonias de bordos dentados, tendo cortes profundos na peripheria e com a superficie estriada: ao lado d'essas colonias apparecem outras mais escuras, cujo aspecto é muito differente; entretanto ellas são constituidas pelos mesmos microbios!

O bacillo cholerico é considerado liquefaciente; pois bem: se esse bacillo é velho a cultura não se liquefaz. Os caracteres classicos podem variar e por isso é preciso estar-se previnido contra essas mudanças que podem levar o observador a tirar conclusões erroneas.

Para bem estudar-se uma cultura em taes condições é preciso comparar as cellulas entre si; n'este caso deixa se

cahir uma laminula sobre uma colonia classica; com a maior delicadeza retira-se a laminula que traz adherente um pouco da cultura; séca-se e colore-se esta, examinando-a depois ao microscopio, onde se colherá dados que afastem qualquer duvida.

Tratando-se de colonias liquefacientes procede-se de modo diverso: toma-se uma gotta em uma lamina especial —uma *lamina cavada*— ; tendo uma depressão no centro e examina-se como uma preparação ordinaria.

Depois de muitas passagens, mesmo quando todas as precauções têm sido tomadas, ficam ainda algumas colonias extranhas á cultura. Recorre se então á *repicagem*, que consiste em colher com a ponta de uma agulha de platina uma parcella minima de uma colonia pura, que semea-se em caldo ou em um meio solido. Esta delicadissima operação da repicagem só pode ser feita levando-se a cultura ao microscopio e exige uma grande habilidade para ferir-se precisamente com a ponta da agulha o ponto extremamente minusculo, de onde se quer retirar uma parcella. Inutil é accrescentar que a repicagem pode ser feita n'esta nova cultura e em outres posteriores, se d'isso houver necessidade.

A gelatina não é a unica substancia empregada para a cultura em placas, e até mesmo tem seus inconvenientes porque liquefaz-se pelo calôr e pelos microbios.

A combinação, já nossa conhecida, da gelatina com o agar fornece um bom terreno de cultura para diffundir-se pelas placas. Procede-se como se tratasse da gelatina pura, tendo, porem, o cuidado de levar as placas á estufa afim de que a gelose adhira ao vidro.

As placas tambem podem ser semeadas pelo processo das estrias: as primeiras estrias são naturalmente mais carregadas do que as subsequentes.

Ha algumas vezes utilidade em contar o numero de colonias de uma placa ou de uma boceta de Petri. O meio

mais simples de o conseguir é collocar a placa sobre um fundo negro. e por cima da placa um vidro, cuja superficie foi riscada por traços parallelos cortando-se em angulos rectos, de modo a formar centimetros ou mellimetros quadrados. Contam-se sucessivamente as colonias de cada pequeno quadrado, o que remove muita causa de erro e facilita a operação de somma total.

Cultura dos Anaerobios

Todos esses processos de cultura que temos estudado até aqui referem se aos microbios aerobios, áquelles que vivem á custa do ar.

A cultura dos microbios anaerobios offerece maiores difficuldades do que os primeiros e exige apparelhos especiaes mais complicados.

Querendo-se fazer a cultura em caldo, lança se mão do apparelho de vidro conhecido por tubo de Pasteur, simples ou duplo, onde é o liquido introduzido ; pela abertura lateral semea-se o tubo, fechando se-a em seguida á lampada. Pela abertura superior faz-se o vasio no tubo, por meio de uma trompa d'agua, ou com o auxilio da machina pneumatica de mercurio, de Alverguiat. A extremidade superior do tubo é por sua vez fechada á lampada no vasio.

Por este processo fica sempre uma certa quantidade de ar que é preciso retirar. o que se consegue fazendo passar pelo tubo uma corrente de um gaz inerte,' (acido carbonico, ou hydrogenio.) que occupa o lugar do pequena quantidade de ar que tinha ficado. Este ultimo processo pertence ao Dr. Roux e é applicavel á gelatina em tubos que operador liquefaz durante a manobra, de modo a poder o ar ser mais facilmente expellido.

Tratando se de culturas em gelatina, feitas com o fim de separar os microbios, o Dr. Roux serve-se de um tubo munido de duas tubuladuras, no qual derrama-se um pouco

de gelatina, que esterilisa-se e semêa-se em seguida, fazendo-se finalmente o vasio pela trompa e pela passagem dos gazes inertes ; fecha-se o tubo á lampada e deita-se-o horisontalmente, formando a gelatina uma especie de gotteira, onde os microbios se desenvolvem.

Para cultivar-se os anaerobios em batata, toma-se um tubo de Roux para a cultura sobre batata ao ar e solda-se á baixo do estrangulamento um outro tubo lateral fechado por meio de uma bucha de algodão ; esterilisa-se e semêa-se ; fecha-se á lampada a parte superior do tubo, emquanto que faz-se o vasio pela abertura lateral, que por sua vez será fechada á lampada.

O Dr. Roux ensina que em logar de fazer-se o vasio, pode se, depois de afilar a parte superior do tubo, fazer passar uma corrente de gaz privado de oxygenio e fechar em seguida as duas extremidades.

Buchner serve se de outro processo para a cultura dos anaerobios : colloca o tubo de cultura já semeado em um outro tubo hermeticamente fechado, contendo *um gramma* de acido pyrogallico secco e *dez centimetros cubicos* de uma solução de potassa á razão de 1 : 10 : o oxygenio então absorvido pela solução alcalina. Alguns experimentadores objectam, porem, que por este processo só conseguiram a cultura de especies indifferentes ou facultativamente anaerobias e nunca de anaerobios exclusivos.

Kitasato junta aos meios de cultura substancias avidas de oxygenio taes como o sulfoindigoato de soda, a resorcina, o formiato de sodio e o pyrogallato de potassa. Liborius junta á gelose *um por mil* de sulfoindigoato de soda e *dous por cento* de glycose, sendo os tubos cheios até os dous terços de sua capacidade, com esta mistura.

Tem-se conseguido tambem cultivar os anaerobios, utilisando-se a avidez que teem certas especies para o oxygenio ; como exemplo ahi estão os caldos, em cuja superficie tenha se formado um véo devido ao desenvolvi-

mento do *bacillus subtilis* : na profundeza d'esse liquido os anaerobios cultivam-se bem.

Nos meios solidos dá-se igualmente o mesmo facto : os aerobios semeados na superficie absorvem todo oxygenio, de modo que o meio torna-se proprio para a cultura dos anaerobios.

EXAME E COLORAÇÃO DOS MICROBIOS

SUMMARIO — Preparações extemporaneas frescas.— Laminas e gottas suspensas.— Puz, sangue e polpa dos orgãos.— Preparações definitivas: fixação e coloração; fixação em culturas puras: calôr, alcool, alcool e ether.—Liquidos pathologicos — Fixadores histologicos.— Orgãos destinados a fornecer córtes.— Technica das inclusões. — Coloração dos microbios em cultura.—Materias corantes.— Microbios que tomam o *gram*. — Coloração dos tecidos. — Dupla e triplice coloração. — Microbios que não tomam o *gram*. — Differenciação por coloração simples. — Methodo de Nicolle. — Theonina. — Coloração dos cilios vibrateis, esporos e capsulas

---

O estudo dos microbios ao microscopio completa o exame a olho nú ou o exame macroscopico das culturas.

Ha duas maneiras de fazer-se a preparação: fazel-a extemporanea e n'esse estado examinal-a, ou fazel-a fixa, definitiva.

A technica da preparação extemporanea é muito simples: com uma pipetta toma-se uma pequena gotta de uma

cultura qualquer ; essa gotta é collocada em uma lamina bem limpa e depois é coberta por uma laminula nas mesmas condições. Em seguida leva-se a preparação ao microscopio, onde será examinada com um forte augmento, a sêcco, ou com o auxilio da immersão ; e como os microbios têm um indice de refracção muito fraco, indispensavel é fazer-se uso da illuminação *Abbé* e n'este caso diaphragma-se fortemente. Assim pode-se distinguir as formas, os caracteres especiaes, mobilidade, pontos brilhantes, etc, dos microbios.

Em alguns casos a laminula pode embaraçar o movimento de que são dotados certos micro-organismos ; exemplo : —o vibrião do cholera que tem um movimento comparavel ao de um enxame de mosquitos ao redor de uma lampada accesa ; para bem apreciar-se este movimento faz se a preparação em uma lamina especial e de que já fallamos em outra parte, lamina que tem no centro uma escavação ou depressão, onde se depõe a gotta de cultura, que adhere á parte central da laminula, ficando em suspenção.

E' de boa pratica e de grande utilidade examinar-se uma preparação no estado fresco ; foi assim que Koch descobrio os esporos do carbunculo e Laveran o *microzoario* da febre palustre : mas as preparações extemporaneas alteram-se depressa e os microbios perdem as suas formas ; e entretanto ha necessidade de conserval-as. Para isso ha varios meios e tratando-se de uma cultura exclusivamente de microbios, sem mistura de outros elementos, a cousa é simples.

--Toma-se uma gotta da cultura, colloca-se em uma lamina e passa-se rapidamente, durante alguns segundos, sobre uma chamma, com o fim de seccar a preparação. E' o methodo de Koch para a fixação, pela coagulação das materias albuminoides, dos microbios, que conservam as suas formas ; mas este processo é imperfeito para a fixação dos elementos mais grossos. O alcool puro, ou este corpo misturado ao ether, coagulando tambem as materias albumi-

noides e deshydratando os elementos, podem servir de fixadores.

Se, porem, os microbios estão contidos no puz, no sangue, de mistura com outros corpos, procede-se assim : recolhe se a gotta do liquido sobre uma lamina bem limpa, secca e aquecida a 35 gráos. Depois *arrasta-se* a laminula sobre a gotta deposta, de maneira a tirar o excesso de liquido, ao mesmo tempo que o manipulador vai soprando sobre a preparação para activar a evaporação e seccar depressa : é o methodo da fixação rapida.

Querendo-se observar as relações dos microbios com os tecidos é necessario recorrer-se aos cortes histologicos.

Em primeiro logar tem-se de fixar os fragmentos á examinar por meio de reactivos diversos. O acido osmico em vapores, ou em solução aquosa, preenche bem este fim, porque forma com o protoplasma das cellulas compostos mineraes inalteraveis, saes que uma vez fixados não mais se modificam. O acido chromico á 1 ou 2 % o acido picrico, o bichromato de potassa, este mesmo sal unido ao sulfato de soda (licor de Muller), o sulfato de cobre, o chlorureto de ouro, o de platina, o sal duplo d'esses dous metaes, prestam-se igualmente a fixar as formas dos elementos histologicos, e têm sido empregados nos laboratorios.

O corpo mais empregado actualmente é o bichlorureto de mercurio em solução aquosa saturada, cujo poder ainda augmenta mais com a addição de cinco por cento de acido acetico. E' assim que se opera : deixa-se o fragmento do tecido em contacto com esta solução durante um tempo que varia com a espessura do córte ; assim, por exemplo, para um corte de um millimetro de lado — uma hora ; duas horas para dous millimetros e assim por diante até *dez horas* para um centimetro cubico.

Ao sahir do *endurecimento* pelo alcool ou pela solução de sublimado, tem-se de *incluir* a preparação para que se possa fazer cortes histologicos bastante delgados e em

condições de serem observados ao microscopio. Diversos são tambem os processos de inclusão e muitas substancias prestam-se a isso : gomma, collodio, colloidina e varios outros.

O melhor e correntemente empregado no «Instituto Pasteur», especialmente no laboratorio do Dr. Roux, é o da parafina. Consiste elle em retirar do sublimado o fragmento e laval-o, acto continuo, em agua commum, depois d'essa lavagem em agua é a preparação lavada successivamente em alcool a 60, a 80, a 90 e a 100 gráos ; em seguida é o fragmento mergulhado em xylol, depois em um banho composto de partes iguaes de parafina e xylol, sendo por ultimo collocado em uma estufa a 50 gráos.

O fragmento se imbeberá da substancia de inclusão e será mettido em um molde onde se solidificará pelo resfriamento, tornando-se um bloco homogeneo que vai se prestar a ser dividido pelo microtomo automatico em tenuissimas fatias proprias para o exame microscopico.

Esta technica tem por objectivo o seguinte : achar priramente uma substancia capaz de deshydratar os tecidos de modo a permittir a penetração da parafina. A substancia que primeiro completa aquella operação é o alcool, que misturando-se com a agua, ou antes roubando-a, deshydrata o fragmento ; este mesmo alcool unindo-se ao xylol permitte a penetração d'este corpo por toda a parte ; o alcool é pois um intermediario precioso, do qual não se deve entretanto abusar para que os elementos anatomicos não sejam deformados.

Saindo do microtomo, os córtes têm o aspecto de fitas franzidas ou pregueadas ; obtem-se que ellas fiquem lisas e estiradas recebendo os cortes em um banho d'agua morna. Para passar-se um pedaço das fitas para uma lamina, bota-se sobre esta uma gotta de albumina glycerinada bem espalhada ; em seguida apanha-se um pedaço do córte tocando-o com um papelinho de seda, ao qual adhere a parcella a examinar ; esta é então *decalcada* sobre a lami-

na, ficando a substancia ahi fixada, ao passo que o papel descolla-se facilmente.

Para que a adherencia do còrte seja completa é preciso aquecer a lamina a 70 gráos ; como ha sempre um resto de parafina a retirar da preparação- faz-se em sentido inverso a serie de manipulações que descrevemos ainda ha pouco : isto é : trata-se o corte pelo xylol, que retira a parafina ; o xylol, por sua vez· é retirado pelo alcool a differentes gráos. emquanto que este ultimo corpo é expellido pela agua simples. Feito isto, estão os elementos histologicos fixados e no estado natural.

Como differenciar agora os microbios de modo a não poder haver confusão entres elles e os elementos anatomicos, em cujo seio se acham ?

—Colorindo-se a preparação. Depois de bem fixadas na lamina pelo calôr, se só ha microbios, sabendo-se que estes organismos são constituidos por uma substancia nuclear. lança-se mão dos reactivos corantes dos nucleos, como o carmin, a hematoxilina, a hematina. etc ; ainda assim estes não satisfazem cabalmente e por isso recorre-se ás côres da anilina.

Estas substancias corantes são divididas em duas classes : côres *acidas* e côres *basicas*. As côres basicas são corantes dos nucleos, e portanto dos microbios. Qualquer d'ellas pode ser empregada em uma solução alcoolica á saturação, que fica sendo a tintura mãi. Dilue-se 1/20, ou 1/30 da solução em agua esterilisada e para que a coloração seja mais viva reforça-se a tinta com uma solução de ammoniaco ou de potassa á 1 para 10,000. Infelizmente. mesmo quando empregadas em solução muito diluida, essas bases alteram as materias organicas e por isso ha toda a vantagem em usar-se da anilina só.

Misturando-se oleo de anilina com agua e agitando-se fortemente a mistura, obtem-se uma agua anilinada na qual as soluções saturadas alcoolicas diluem-se nas propor-

ções ordinarias ; é este o processo de Erlich, no qual emprega-se a violeta de geneciana.

A agua phenicada de 1 a 5 % em que dilue se a solução alcoolica mãi, ainda é mais energica : obtem-se por este meio a fuchsina, ou violeta de geneciana phenicada.

As preparações são immergidas durante uns cinco minutos n'essas soluções corantes, e depois são lavadas em agua pura e por fim montadas pelos processos conhecidos em technica microscopica.

Gram aperfeiçoou aquelles processos de coloração. Depois de mergulhar as preparações em uma solução de anilina elle trata-as por uma solução iodada assim composta :

Iodo sublimado .... 1 parte
Iodureto de potassium.......... 2 partes
Agua................... .... 100 partes.

Em seguida a este banho são as preparações mergulhadas por alguns instantes no alcool, com o fim de obter-se uma ligeira descoloração.

Certos microbios conservam a materia corante, outros, pelo contrario, a perdem n'esta solução ; d'ahi veio a ideia de dividir os microbios em duas grandes classes : microbios que tomam o *gram* e microbios que não o tomam.

Quando tem-se de fazer pesquizas no sangue, deve-se ter bem presente ao espirito que é indispensavel colorir os microbios e os globulos sanguineos.

Para os globulos temos as côres acidas da anilina, que são corantes do protoplasma e dos elementos anatomicos.

A *éosina* é a cor geralmente preferida para este fim : uma vez tingidos os globulos, é necessario colorir os microbios, escolhendo-se então a solução corante, conforme a propriedade que tem o germen de tomar, ou não, o *gram*.

Se é, por exemplo, o bacillo do carbunculo que desejamos pôr em evidencia no sangue de um animal carbunculoso, procede-se assim : estende-se, secca-se e fixa-se um pouco do sangue sobre a lamina pelos processos descriptos

mais atraz; trata-se em seguida a preparação pelo «violêta de genciana» durante cerca de uns cinco minutos; lava-se em agua commun; mergulha-se depois a preparação na solução iodo-iodurada de Gram, durante um ou dous minutos, até que a lamina tome uma côr bem carregada. Descora-se em seguida no alcool absoluto, tão completamente quanto possivel; lava-se em agua e por fim immerge-se durante uns *dous* minutos na solução aquosa de éosina. Ao exame microscopico os bacillos se mostrarão coloridos de violêta, os globulos sanguineos descorados e o fundo da preparação apresentará a coloração rosea da éosina.

Procuremos agora demonstrar a existencia de staphylococcus no puz. Antes de tudo lembremo-nos de que os leucocytas teem um nucleo e um protoplasma: para os nucleos usaremos do carmin, ou do picro-carmin; para o protoplasma escolheremos uma côr acida — a éosina — por exemplo. Trata-se em seguida a preparação pelo methodo de Gram e se houver microbio este apparecerá colorido de violêta; do contrario só serão vistos os elementos do puz em um fundo roseo-carmizin.

E' este um processo de coloração muito commodo, e com a modificação introduzida depois por Weigert ainda tornou-se melhor: em lugar do alcool, usa-se hoje do oleo de anilina, como descorante.

Nicolle emprega a acetona dissolvida na proporção de 1/6 em alcool, dissolução que constitue um descorante muito rapido.

Os microbios que não tomam o *gram* são um pouco mais difficeis de pôr-se em evidencia nas preparações. O processo a empregar n'este caso é o seguinte: immerge-se a lamina em anilina phenicada, de modo a coloril-a energicamente e descora-se em seguida pelo alcool. Por este processo o bacillo conservará melhor a materia corante; entretanto a operação é delicada e deve ser acompanhada ao microscopio, afim de que se possa julgar bem do gráo de coloração.

Ha alguns processos exclusivos de certos microbios que serão indicados em outra parte, quando tratar-se do estudo especial de cada um d'aquelles germens.

Nicolle notou que o tannino, aliás já desde muito tempo empregado na tinturaria, fixava muito bem as côres azues, as quaes, combinadas com aquelle corpo, ficam insoluveis nos diversos reactivos: e baseando-se n'este facto Nicolle simplificou a technica da coloração com o seu methodo pelo azul de methylene, acido phenico, etc. Os tecidos tomam porém a mesma côr dos outros elementos de modo que é difficil, senão impossivel, distinguir-se os microbios da preparação.

A *thionina* é uma côr visinha do azul de methylene. Em solução phenicada ella dá matizes differentes, segundo a reacção dos tecidos ou dos corpos sobre os quaes actúa: é assim que os nucleos são coloridos de azul carregado, os protoplasmas de azul desmaiado e os globulos sanguineos de verde. A introducção da thionina na pratica bacteriologica marca um dos maiores progressos na techinica da coloração, especialmente para os microbios que não tomam o gram. As preparações são deshydratadas pelo alcool, cujo contacto com os tecidos pode, sem inconveniente ser prolongado, por isso que não ha risco de destruir a materia corante, que fixa-se bem sobre os elementos de sua escolha. O microbio do *mormo* até então rebelde aos outros processos de coloração, tinge-se bem pela thionina, que é, repetimos, uma substancia que presta excellentes serviços em microbia.

Ha ainda o methodo de Ehrlich, que consiste em deixar-se a preparação mergulhada em uma solução anilinada, a frio durante 24 horas, ou a quente pelo espaço de 6 horas apenas. Como descorante Ehrlich serve-se do acido azotico a 1/3 ou 1/4, solução que não ataca a coloração do bacillo, mas descóra os tecidos. O acido sulfurico tambem produz o mesmo effeito; mas ambos os acidos têm o defeito de alterar os tecidos, descorando-os bruscamente.

Kühne faz uso de uma côr phenicada. Tratando-se a

preparação por um soluto de anilina a 2 % e um pouco de acido chlorhydrico, esta solução pode ficar muito tempo em contacto (mesmo a quente) com a preparação sem alteral-a.

Em resumo: uma escolha judiciosa dos processos de coloração só pode ser feita por quem tiver um longo habito de manipulal-os e experimental-os na technica microbiana, para bem poder comparar as suas vantagens e desvantagens.

Se a coloração do corpo das bacterias é relativamente facil, enorme é a difficuldade quando trata-se de pôr em evidencia os cilios vibrateis, os esporos e as capsulas de taes micro-organismos; e como os processos ordinarios de coloração não servem para o caso, ha necessidade de recorrer a algum artificio.

Cohn foi o primeiro que tentou colorir os cilios vibrateis das grandes bacterias; n'este proposito elle mantinha os germens em uma solução concentrada de páo campeche; mas Cohn só obteve resultados medíocres, porque a coloração era muito desmaiada.

Kohc aperfeiçoou o processo, empregando o bichromato de potassa, no qual deixava mergulhadas as suas preparações durante 24 horas; ainda assim os resultados não eram completamente satisfactorios, porque certos microbios interessantes como o *bacillus subtilis*, o *vibrião do cholera* e o *bacillo de Eberth* não mostram os seus cilios por este processo.

Foi então que Nenhaus, tendo em mente o processo tão empregado na industria pelos tintureiros, que para fixarem as côres usam de certas substancias, ditas *mordentes*, introduzio esse processo na technica da coloração dos cilios.

Sabia-se, de facto, que os fios de origem animal, como a lan e a seda, tomam bem as côres; outros, porem, os de origem vegetal, como o linho e o algodão difficilmente conservam as tintas. E para facilitar a fixação das côres sobre tecidos d'esta ultima especie, procura-se *sensibilisar*

a fibra, pondo-a em contacto com um composto metallico, que fixando-se sobre ella, comportar-se-á mais tarde do mesmo modo em presença da materia corante. E' a esta substancia fixadora que chama-se *mordente*. Os saes de ferro, de estanho, de chromo, de anilina e muitos outros prestam-se bem ao papel de mordentes.

Nenhaus servio-se da tinta de escrever que, como sabe-se, é um tannato de ferro; com este corpo elle obteve bom resultado.

Löffler, considerando que as tintas teem uma composição variavel, propoz um liquido assim composto:

Tannino a 20/80........................ 10 volumes.
Solução saturada de sulfato de ferro
a frio.................................... 5 volumes.
Solução alcoolica saturada de fuchsina...... .... 1 volume.

Apezar de bom, este liquido não se presta a colorir os *flagella* ou cilios de certos microbios.

Um simples acaso mostrou a Löffler que ha micro-organismos colorindo-se uns em uma solução acida, ao passo que outros exigem um liquido basico. Löffler, por inadvertencia, tendo deixado aberto o frasco contendo a sua solução, notou que esta carregou-se dos vapores ammoniacaes, que existem sempre de mistura com o ar na atmosphera dos laboratorios. E ficou verificado que para os bacillos *fluorescente*, *pyo-cyanico* e outros deve-se juntar um acido ao liquido; em quanto que para o *B. Coli* e o *typhico* é um alcali a substancia que se deve incorporar. Löffler toma um pouco de cultura, dissolve-a em agua, sécca e faz então agir o mordente, antes de mergulhar a preparação no azul de methylene: apezar de tudo a coloração não fica bem accentuada.

Nicolle e Morax preconisam o seguinte processo: dissolvem-se em um pouco d'agua os microbios de uma cultura em estado de pureza; toma-se em uma pipetta uma gotta d'aquella solução; estende-se esta gotta sobre uma laminula

bem limpa que deixa-se seccar ao ar livre. Em logar de deixar o mordente em contacto com a laminula durante *cinco minutos*, o que favorece o apparecimento de um *véo* que mascara a preparação (e toda a habilidade é pouca para evitar este *véo*), elles guardam intervallos na applicação do liquido fixador. Assim, deitam uma gotta do mordente sobre a preparação, que é aquecida a uma chamma, até o ponto em que se desprendem os primeiros vapores; depois lavam-na e recomeçam a operação duas, tres, quatro vezes, applicando o liquido mordente pelo modo que fica dito. Depois de uma lavagem cuidadosa, terminam as manipulações por uma coloração, tambem fraccionada, pelo violêta de genciana phenicado.

O Dr. Borrel, preparador do laboratorio do professor Roux, substitue para maior commodidade a laminula pela lamina, o que facilita muito mais as operações, não havendo o risco de poluir-se a preparação.

Alguns empregam o liquido de Ziehl, usando do processo acima descripto.

Bunge emprega o perchlorureto de ferro a 1/20 e o tannino nas mesmas proporções em que Lœffler usa.

Van Ermeyen emprega um processo photographico muito delicado, mais que dá excellentes resultados. Depois de ter feito a diluição e de ter espalhado uma gotta sobre uma lamina bem limpa e sêcca, elle fixa o microbio por meio do tannato de osmium, deixando este composto em contacto com a preparação durante meia hora, ou somente 10 minutos a 70° ou 80 gráos. Lava em seguida a preparação com agua distillada e mergulha-a em uma solução sensibilisadora de nitrato de prata a 0,50 %, ou mesmo a 1 %; depois, sem lavar a preparação, elle immerge-a em um banho reductor. Se a coloração é insufficiente elle recorre de novo ao nitrato de prata e ao banho reductor; depois lava, secca e monta a preparação. O methodo é bom e os resultados seguros, mas exige um rigoroso asseio nas manipulações, do contrario nada se consegue de nitido.

A composição dos liquidos usados por Van Ermeyen é a seguinte:

Fixador.....	Acido osmico a 2 %......	1 parte.
	Tannino á 20/80	2 partes
Sensibilisador—Nitrato de prata a...		0,5 %
Reductor..	Acido gallico.......	5 grammas.
	Tannino.....................	8 »
	Acetato de soda fundido	10 »
	Agua	350 ».

Os esporos, que são envolvidos por uma membrana muito resistente, tomam difficilmente as côres; mas estas uma vez fixadas difficilmente desbotam. Para colorir os esporos ha o methodo de Neisser, que não vale a pena descrever, porque hoje só se emprega o de Müller, que lhe é muito superior. Este ultimo consiste em fixar a preparação pelo alcool absoluto, prolongando o contacto por cinco minutos. Sem laval-a faz-se actuar o mordente, que aqui é uma solução de acido chromico a 5 %, tambem durante cinco minutos. Depois d'isso é a preparação bem lavada e immergida no *ziehl* durante um quarto de hora. A descoloração faz-se pelo acido sulfurico a 3 %, pelo acido nitrico, ou pelo oleo de anilina. Nova lavagem e termina-se colorindo pelo azul de methylene, afim de que appareça a differenciação.

Buchner propõe que se aqueça a lamina a 120 gráos, porque o calor modifica o involucro do esporo, que assim toma melhor a tinta; mas em compensação as formas se alteram, e na verdade isso é um grande inconveniente.

Para as capsulas, como as do *pneumococco* Talamon-Fraenckel e do *pneumobacillo* de Friedlander, bastam ás vezes os methodos de coloração ordinaria. Friedlander empregava uma solução de acido acetico, depois expunha a sua

preparação a uma corrente de ar e uma vez sêcca, elle a coloria sem lavar.

Ribbert usa da seguinte mistura:

Agua...........................	100 grammas
Alcool a 90°..................	50 »
Acido acetico................	12 »

Aquece-se e junta-se o *dhalia* até á saturação.

Como complemento deste capitulo sobre a coloração dos microbios e seus orgãos locomotores damos a lista das côres e as formulas mais usadas nos laboratorios de bacteriologia.

Côres da anilina

- Côres basicas A
  - Vermelhas
    - Fuchsina.
    - Rubina.
    - Vermelho diamante
  - Violetas...
    - Violeta de genciana.
    - Violeta de methyla. (1 B, 5 B, 6 B)
    - Krystall-violeta.
    - Violeta-dhalia.
  - Azues......
    - Azul de methylene.
    - Azul Victoria.
  - Verde......--Verde de methyla.
  -
    - Vesuvina.
    - Pardo de Bismarck.
- Côres acidas........................ B
  - Acido picrico.
  - Tropœolina.
  - Fluoresceina.
  - Safranina.

FORMULAS :

AZUL DE LÖFFLER

Potassa a 1/10,000........................ 3 c. c.
Sol. alcoolica de azul de methylene. 1 c. c.

——

LICOR DE ZIEHL

Fuchsina.......................... 1 gramma.
Alcool absoluto.................. 10 grammas.
Agua phenicada a 5% .... 100 grammas

———

LICOR DE GRAM

Agua de anilina................................ 10 c. c.
Alcool absoluto................................ 1 c. c.
Sol. alcool. sat. de violeta de genciana.. 1 c. c.

———

LICOR DE EHRLICH

(A)

Agua anilinada................................... 9 c. c.
Alcool absoluto................................... 1 c. c.
Sol. alcool. de fuchsina........................ 1 c. c.

(B)

Agua de anilina................................. 9 c. c.
Alcool absoluto................................. 1 c. c.
Sol. alcool. sat. de violeta de genciana.... 1 c. c.

———

AZUL DE ROUX

(A)

Violeta de dhalia..............	1 gramma
Alcool a 90°......	10 grammas
Agua distillada..............	90 grammas

(B)

Verde de methyla............	1 gramma
Alcool a 90°...................	10 grammas
Agua distillada...............	90 grammas

O azul obtem-se pela mistura de um terço da solução A com dous terços da solução B.

PICRO-CARMIN

(*Orth*)

Agua sat. de acido picrico................	1 volume
Solução de carmin de Orth	1 »

INOCULAÇÕES EXPERIMENTAES

SUMMARIO — Preparação das materias a inocular. — Seringas. — Os animaes : maneira de contel-os.—Escolha da região a inocular. —Utilidade de ensaios em varias especies.— Quantidade de virus a injectar. — Associação de diversos virus.— Gaiolas para os animaes inoculados. — Limpeza e conservação dos instrumentos.

Para estudar-se convenientemente as molestias infecciosas é preciso fazer-se inoculações nos animaes.

Estas inoculações são verdadeiras culturas microbianas e o animal torna-se precisamente um meio de cultura ; pelo que é claro, que ellas devem ser feitas nas mesmas condições de rigorosa pureza que sobre os meios ordinarios, solidos ou liquidos. E nos animaes revestem as culturas um caracter de maior relevancia, visto como trata-se de observar os symptomas de um determinado microbio.

A technica a seguir não é complicada : supponhamos o virus a inocular-se proveniente de uma cultura liquida. Por meio de uma pipetta previamente passada pela chamma de um bico de gaz ou de uma lampada de alcool, recolhe-se

um pouco da cultura e deposita-se em um calix previamente esterilisado.

Feito isto e antes de qualquer inoculação ou injecção no animal, é de rigorosa necessidade que o experimentador adquira a certeza de que a sua cultura é realmente pura e para isso elle a examina ao microscopio de modo completo e consciencioso.

Aqui cabe lembrar outra precaução que nunca deve ser despresada : — é a de esterilisar-se a pipetta immediatamente depois de servir-se d'ella, fechando-a á lampada para evitar a projecção de qualquer gotta do liquido virulento sobre a meza de trabalho, o que poderia produzir casos terriveis de contagio. Depois deve-se collocar a pipetta em vaso apropriado para ser mais tarde esterilisado com o seu contendo, pelos processos já descriptos. Não é demais insistir-se sobre a grande importancia d'estas precauções contra a possibilidade de um contagio accidental.

O calix contendo o nosso virus deverá ser immediatamente coberto com um pedaço de papel *buvard*, o que evitará a queda de poeiras atmosphericas sobre o liquido. Quando se tiver de carregar a seringa de injecção não se deve levantar o papel : basta atravessal-o com a agulha e aspirar o liquido.

Em seguida, estando o animal bem contido, lava-se a região em que se tem de operar com um liquido antiseptico e enxuga-se com papel de seda esterilisado e nunca com esponjas.

Se trata-se de uma simples injecção hypodermica nada mais tem-se a fazer do que praticál-a como qualquer injecção sub-cutanea ordinaria. Se é uma injecção intra-venosa põe-se a veia saliente pela compressão e introduz-se a agulha.

O operador terá sempre a seu lado grande provisão de pedacinhos de papel de seda esterilisado que substituirá a esponja em todas as occasiões em que d'ella houver necessidade.

Si se tiver de fazer alguma sotura e o fio fôr o *cat-gut*, será este esterilisado por um processo especial :—expõe-se o fio aos vapores de alcool e guarda-se-o em tubos fechados. contendo caldo esterilisado ; porque se qualquer germen existir por acaso no fio, ou no intestino que servio para preparal-o, pode proliferar no caldo, e então no aspecto turvo d'este tem-se um criterio seguro para julgar-se, pela simples inspecção, das más condições do fio, que deve ser n'este caso rejeitado.

Se a cultura é solida toma-se uma espatula de platina (sempre previamente esterilisada) e com ella recolhe-se uma pequena parcella da cultura, que dilue-se em agua ou caldo esterilisado, esmagando-a de encontro ás paredes do calix.

Quando o virus deve ser recolhido de um animal morto, corta-se o pello d'este, queima-se a pelle da região em que se tem de operar com um ferro em braza e introduz-se a pipetta exploradora. As mesmas precauções são indispensaveis quando se quer recolher o sangue de uma viscera qualquer : depois de autopsiado o animal é preciso sempre esterilisar, pela queimadura, a superficie do orgão por onde a pipetta tem de penetrar.

O instrumento usado geralmente para as inoculações é a seringa de Pravaz, de dimensões variaveis ; mas foi preciso introduzir-lhe uma modificação na materia que reveste o piston, sendo o couro proscripto, porque não se presta a uma desinfecção seria, sem estragar-se.

Actualmente ha excellentes seringas correspondendo perfeitamente á rigorosa asepsia que exige a technica bacteriologica : entre outras basta-nos citar a seringa de *Straus-Colin*, cujo embolo é constituido pela substancia medular do sabugueiro (*moelle de sureau*) ; esta substancia resiste, sem se alterar, á desinfecção no autoclave. O Dr. Roux propoz a agulha de *platina iridiada*, que não oxyda-se.

Os animaes destinados ás experiencias devem ser contidos, seja por um ajudante, seja por meio de apparelhos

especiaes. Ha uma infinidade de apparelhos para este fim; uns mais simples, outros mais complicados, alguns cheios de dispositivos mais aparatosos do que uteis, ao passo que os ha tambem de grande simplicidade e muito praticos; n'este numero incluiremos as pinças para conter os coelhos, cobayos e ratos, que subjugando completamente esses pequenos animaes, evitam que elles mordam o experimentador, que pode então trabalhar muito commodamente e em qualquer posição, com toda a calma e segurança. Á pezar de tudo, diz o professor Roux, um dos melhores *apparelhos contentivos* ainda é um bom servente de laboratorio.

Ha toda a vantagem em experimentar sobre um grande numero de especies animaes. Certos microbios que não agem sobre algumas especies, cultivam-se pelo contrario muito bem em outras; porque cada especie reage ao seu modo sobre os diversos virus.

Portanto quem introduzir na technica bacteriologica um animal novo deve ter o reconhecimento dos experimentadores. Os grandes animaes como o boi, o cavallo, o asno prestam-se bem as inoculações; mas nas experiencias de laboratorio, não somente pelo seu custo elevado, difficul dades de contel-os, carestia da alimentação, como tambem pela falta de espaço para alojal-os, esses animaes são postos de lado; assim como, ainda que em menor escala, os carneiros e os cães, que não offerecem as facilidades dos coelhos, cobayos, ratos, camundongos (*souris*), pombos, que são os animaes geralmente preferidos.

A região a innocular-se varia com o animal e com a quantidade de liquido que se quer ou se deve injectar.

Tanto quanto possivel deve-se escolher um ponto que não possa ser attingido pelo animal, de modo que este não possa lamber nem arranhar o logar inoculado; condições difficilmente realisaveis, devido á conformação anatomica da maior parte dos animaes e á facilidade de movimentos de que são elles dotados.

Muitas vezes é util fazer inoculações na orelha do

coelho. Esfregando-se a orelha, ou lavando-se-a com agua quente, as veias d'esta região intumescem, bem como as arterias, deixando se ver por transparencia ; comprime-se a orelha pela sua base e faz-se a injecção. Acabada esta deve-se lavar immediatamente a seringa, porque as materias albuminoides coagulando-se vão obstruir a agulha.

Nos pequenos animaes, como os ratinhos (camundongos), é preferivel fazer a injecção na jugular, que é um vaso calibroso e portanto mais facil de manejar.

As injecções podem ser tambem intra-musculares, intra-peritoneanas, intra-craneanas, etc. Suas denominações estão indicando as diversas technicas a seguir-se.

Querendo-se praticar uma injecção tracheal, põe-se a trachéa a descoberto e faz-se atravessar a sua parede anterior pela agulha da seringa, injectando-se pouca quantidade de liquido e sempre abaixo do larynge, afim de evitar os reflexos e a suffocação.

As injecções intra-oculares são de grandes vantagens, porque pode-se ver e acompanhar o desenvolvimento da cultura, que faz-se muito bem no humor aquoso ; pode-se não somente seguir dia a dia o desenvolvimento da cultura, como até retirar d'ella, de tempos a tempos, pequenas porções. Mas sempre que se tiver de fazer uma injecção d'esta natureza deve-se deixar correr primeiramente um pouco do liquido da camara anterior para evitar a tensão que se daria infallivelmente no olho do animal pelo augmento de liquido resultante da injecção.

As injecções na cauda dos ratos constituem um processo commodo, sob varios pontos de vista, sobrelevando o de poder-se á vontade ir amputando successivamente o appendice caudal, quando ha n'isso conveniencia.

Querendo-se introduzir o virus na cavidade estomacal pode-se reunil-o aos alimentos, ou então por meio da sonda esophagiana fezel-o chegar ao estomago. Tratando-se de pequenos animaes, como por exemplo o cobayo, este processo ultimo deve soffrer uma ligeira modificação : em vez

da sonda esophagiana deve-se usar de uma sonda urethral de gomma elastica n°. 6 ou 8, da escala de Charrière. No acto da introducção deve haver todo o cuidado em evitar-se a trachéa-

A quantidade de virus a injectar deve merecer toda a attenção, verificando-se com cuidado a graduação da seringa. Certos virus têm uma actividade assombrosa: basta lembrar que uma *cente-millionesima parte de um centimetro cubico* da toxina do tetanos pode causar accidentes graves.

Essa quantidade de virus varia naturalmente com o tamanho ou peso do animal e conforme os resultados obtidos pelas primeiras inoculações. A idade das culturas e a resistencia individual dos animaes têm tambem sua influencia; mas a este respeito nada se pode precisar de ante mão e nenhuma regra nos é permettido formular.

Um virus inactivo por si mesmo pode, associado a outro, ficar com as suas propriedades exaltadas; e pode ainda ter acção sobre uma especie animal anteriormente insensivel ao virus, ou mesmo ficar attenuado em seus effeitos. São questões a estudar-se em cada caso em particular. Como exemplo podemos citar o carbunculo, a cujo microbio é o coelho refractario; mas o *micro-bacillus prodigiosus*, que por si mesmo é inoxio, injectado ao mesmo tempo que o bacillo do carbunculo no coelho, produz a molestia n'esse animal. Ha varias combinações n'esse genero.

Finalmente os animaes devem ser guardados em gaiolas ou pequenas jaulas e grupados por especies. Certos compartimentos só deverão conter animaes inoculados com o mesmo virus, principalmente se este é contagioso, como é quasi a regra geral. As gaiolas devem ser metallicas, de modo a poder-se laval-as largamente e esterilisal-as pelo fogo. Serão ainda collocadas de maneira que as dejecções dos animaes de umas não caiam sobre as outras.

Quanto aos animaes, é claro que serão mantidos nas melhores condições hygienicas, e bem alimentados; a menos que, com o intuito experimental, queira-se enfra-

quecel-os, dando-lhes uma ração insufficiente e um accrescimo de trabalho.

Para conservar-se os instrumentos ao abrigo da ferrugem são elles collocados em uma caixa especial de fundo duplo, contendo uma solução de agua e borax, na razão de 3 %. Os instrumentos estão sempre mergulhados n'esta solução e só sahem d'ahi quando se tem de trabalhar com elles ; acabado o trabalho voltam os ferros ao seu banho, que é levado á ebullição. De tempos a tempos é preciso renovar a agua que se evapora ; porque a quantidade de borax permanece sempre a mesma. Esta pratica é corrente nos varios laborátorios do Instituto Pasteur e os instrumentos conservam-se indefinidamente isentos de ferrugem.

Este capitulo poderia ir muito longe se quizessemos fazer a descripção de apparelhos e processos meticulosos, porem de utilidade muito contestavel ; sendo verdade que os mais simples são justamente os melhores. O ponto capital porem, é que tanto os instrumentos como as manipulações assentem em uma asepsia rigorosa ao excesso.

Os cuidados de asseio e a preoccupação de uma pureza completa dominam toda a technica bacteriologica em geral e das inoculações em particular.

MICROBIOS DO AR

SUMMARIO — Poeiras e microbios do ar. — Demonstração de sua existencia. — Analyse do ar contendo germens. — Contagem d'estes. — Maneira de semeal-os. — Inconvenientes dos meios gelatinados. — Experiencias de Miquel. — Influencia das estações — Ar dos aposentos; dos hospitaes; das montanhas; do mar. — Ar expirado. — Germens pathogenicos. — Variações dos germens durante as horas do dia. — Apparelhos registradores.

O ar que respiramos, apezar de seu aspecto transparente, é carregado de poeiras, de germens e de impurezas de toda especie. Para nos convercermos d'este facto basta examinar um raio de sol penetrando em um quarto escuro; ahi veremos dansando em suspensão milhões de corpusculos que a luz torna visiveis, n'aquellas condições.

Trata-se agora de conhecer a natureza, a forma, a composição chimica, a historia natural d'essas poeiras que nós introduzimos nos pulmões.

Se collocarmos em um aposento, onde ninguem vá habitualmente, uma placa de vidro sobre um movel qualquer, no fim de algumas horas esta placa, que antes era perfeitamente limpa, ficará coberta de poeira.

Se aquecermos a poeira até á calcinação em uma capsula de platina, notaremos pelo cheiro, que ahi ha materias organicas.

Em Pariz verifica-se que, em um metro cubico de ar as poeiras, depois de calcinadas, fornecem um residuo pesando em media de 5 a 8 milligrammas. Entretanto esses resultados variam com o estado de seccura ou de humidade, com as varreduras, ou com qualquer movimento no ar.

N'aquella cidade em tempo secco, obtem-se até 25 centigrammas por metro cubico; ao passo que depois de uma chuva, que tenha, por assim dizer, lavado a atmosphera, acarretando as poeiras, encontram-se apenas 6 miligrammas.

As poeiras examinadas ao microscopio apresentam os elementos os mais variados: crystaes de sal marinho e de sulfato de soda, particulas de pedras calcareas, restos de pennugem de azas de insectos, esporos de mofos, grãos de pollen, de amydon, pedaços de fios de lã, esporos de bacterias, corpusculos opacos diversos e muitos outros.

A presença de germens microbianos nas poeiras atmosphericas foi demonstrada em 1862 por Pasteur em sua celebre memoria intitulada «Germens organisados da atmosphera». Elle o demonstrou recolhendo sobre algodão essas poeiras e semeando-as em meios esterilisados.

Condensando-se na superficie fria e esterilisada de um corpo qualquer que a isso se preste, o vapor da atmosphera (que é sempre carregado dessas poeiras) e semeando-se a agua de condensação em um meio apropriado, obtem-se igualmente culturas que demonstram o facto.

Na mesma serie de experiencias Pasteur demonstrou que, muito mais numerosos perto do solo, esses germens tornam-se mais raros e desapparecem mesmo, á medida que se vai subindo uma montanha, ou que se attinge alturas consideraveis em balão; demonstrou tambem que na atmosphera maritima ellas não existem e que na visinhança das habitações são mais numerosas do que nos campos.

Pasteur servia-se de um balão de gargalo comprido, e

terminado em ponta muito afilada ; enchia-o de agua de levêdo e fazia ferver. O vapor sahindo pelo orificio apertadissimo do bico do balão adquiria uma pressão sufficiente para arrastar todo o ar contido no interior. Terminada a esterilisação era a ponta do gargalo fechada ao maçarico.

Pasteur preparava por este processo até 100 balões ao mesmo tempo e transportava-se com elles ao logar onde tinha de fazer a analyse do ar, operando da seguinte maneira : primeiramente passava a extremidade do gargalo do balão pela chamma de alcool e com uma pinça tambem esterilisada por esse meio rapido, elle quebrava a ponta afilada do vidro. Pela abertura o ar penetrava tumultuariamente com os seus germens no interior do vaso : este era de novo fechado ao maçarico e collocado em uma estufa, onde no fim de alguns dias os germens começavam a proliferar.

Ás vezes era necessario prolongar a permanencia da cultura na estufa até por 30 dias ; isso porque certos esporos, que ha longo tempo fluctuavam na atmosphera e tinham passado ahi por varias vicissitudes, perdiam um pouco de sua vitalidade e só muito difficilmente readquiriam o vigor primitivo.

Posteriormente outros experimentadores imaginaram varios processos, que afinal de contas não são mais do que variantes dos principios estabelecidos por Pasteur.

Houve uma epoca em que tambem estiveram em uso os *aeroscopios*. Miquel inventou um d'esses apparelhos muito engenhoso, trazendo um contador de ar ; mas tanto este como os outros apparelhos congeneres, foram logo abandonados porque não deram resultados precisos.

Provada a existencia de germens na atmosphera foi preciso contal-os, o que não era difficil fazer desde que esses germens fossem collocados em condições de se desenvolver em colonias, sobre meios solidos ou liquidos.

Outr'ora só estes ultimos meios eram empregados ; elles apresentavam .grandes inconvenientes, porque se o

meio era acido as bacterias não proliferavam ; se era alcalino os mofos não appareciam.

Miquel servia-se de um balão contendo caldo e munido de duas tubuladuras. Por meio de um contador elle aspirava o ar que, passando pelo liquido, vinha misturar-se com este ; depois, voltando ao laboratorio Miquel repartia o caldo assim arejado, por uns cincoenta tubos esterelisados ; era então possivel contar em cada um d'esses tubos de cultura a quantidade de germens ahi existentes.

Para évitar-se a proliferação dos germens (o que traria necessariamente a confusão e nullificaria os calculos) em lugar do caldo, emprega-se hoje a agua distillada, conservando-se, alem d'isso, os vasos de cultura em geleiras. Miquel tambem opera em matrazes de fundo chato com duas tubuladuras, nos quaes mergulha-se uma pipetta terminada na parte superior por uma cobertura especial e obturada por uma bucha de algodão.

Todos estes methodos teem por fim receber um certo volume de ar e repartil-o por tubos de cultura para facilitar a contagem.

Koch lembrou-se dos meios solidos ; em uma primeira experiencia abandonou simplesmente ao contacto do ar uma placa nutritiva, sobre a qual os germens poderam desenvolver-se ; mas lhe foi impossivel contal-os.

Mais tarde este methodo do Koch passou por um aperfeiçoamento com o apparelho de Hesse :— um longo tubo contendo gelatina em torno de suas paredes, como nos tubos de Esmarch, no qual passa uma dada porção do ar a examinar, eis em que consiste este apparelho.

Muitos outros apparelhos vieram depois : o de Frankland, em que uma pasta de algodão retinha os germens ; o de Petri, onde o algodão era substituido por areia, a que mais tarde elle juntou gelatina ; o de Straus e Wurtz que compunha-se de um tubo em U onde introduzia-se gelatina liquefeita em um dos ramos ; fazia-se passar em seguida uma corrente de ar que entrava por um dos ramos

e sahia pelo outro; por meio de uma gotta de oleo evitava-se que se formasse espuma por occasião da passagem do ar. A gelatina aspirada pela pipetta era espalhada sobre placas e a parte que ficava adherente ás paredes era contada directamente como no apparelho de Hesse, sendo este resultado reunido ao que se obtivera nas placas, para constituir a somma total.

Todavia eses diversos methodos teem os mesmos inconvenientes, porque empregam a gelatina e os resultados obtidos não são os mesmos; apenas podem ser comparados uns com os outros, isso quando se tem empregado o mesmo apparelho; d'ahi a necessidade indeclinavel de indicar-se sempre o processo de que servio-se o analysta.

Actualmente Miquel—o conhecido bacteriologista do observatorio de Montsouris, sob o nome de methodo mixto, emprega o seguinte processo: faz passar pelo interior do seu antigo matraz (de que já nos occupamos) um jacto de ar que vai misturar-se com agua existente no vaso; em seguida semea o liquido em uma serie de tubos de agar-gelatinado.

O conteúdo d'esses tubos é derramado sobre placas, ou nos matrazes de Erlemeyer, que, como é sabido, são uma modificação do balão-Pasteur.

Logo que o agar-gelatinado solidifica-se pela baixa temperatura, Miquel colloca os seus vidros na estufa e vai observando diariamente o que se passa no fundo dos vasos.

O sulfato de soda tambem serve para recolher os germens: começa-se por deshydratal-o e reduzil-o a um pó fino; colloca-se este pó em um tubo entre duas camadas de algodão, passando-o antes pelo tamiz esterilisado no bico de Bunzen. Deixa-se então passar o ar que se quer analysar atravez d'essa bucha; sobre o sal não ha risco de que os germens se desenvolvam. Os tubos poderão ser assim conservados durante muito tempo e ser transportados de um logar para outro, em uma viagem de estudos. Este engenhoso processo é devido a Pasteur; Miquel, porém, com-

pletou-o introduzindo as rolhas de vidro que feeham os tubos.

A natureza dos microbios varia, conforme se examina o ar de uma cidade ou o do campo. As diversas horas do dia e as estações do anno influem tambem sobre a qualidade e sobre a quantidade dos germens.

Em seguida damos um quadro das médias annuaes encontradas no decennio de 1881 –91 e referindo-se á quantidade e qualidade dos germens contidos em um metro cubico de ar recolhido em Pariz, não só na Praça de Saint-Gervais, que fiea no centro da grande cidade, como no Parque de Montsouris, situado em um quarteirão excentrico para o lado do sul da mesma cidade.

PRAÇA DE S. GERVAIS

Bacterias—4970--Mofos—1490.

Relação entre as bacterias e os mofos :

$$\frac{100}{321}$$

Total dos germens............ .... 6.280

PARQUE DE MONTSOURIS

Bacterias—345—Mofos—210.

Relações entre as baeterias e os mofos :

$$\frac{100}{164}$$

Total dos germens...... 555

É notavel a differença entre os germens existentes no ar do eentro da grande cidade e em um dos pontos da peripheria. Esta regra applica-se a todas as cidades.

Nos hospitaes, por causa da grande agglomeração de pessôas em um espaço relativamente aeanhado, os germens são em numero eonsideravel.

Dos estudos comparativos do professor Straus feitos na sala *Michon*, do hospital da Pitié e na sala da *Mairie* do 4° *arrondissiment*, que lhe fica muito proxima, durante os mezes de Março a Novembro de um mesmo anno, resulta o seguinte quadro de germens encontrados em um metro cubico de ar :

SALA MICHON	MEZES	SALA DA MAIRIE
11,000	Março..............	750
10,000	Abril................	950
10,000	Maio............. ...	1,000
4,500	Junho..	1,550
5,800	Julho.................	1,400
5,540	Agosto.......	900
10.500	Setembro...	990
12,400	Outubro.....	1,070
15,000	Novembro..	820

Nos hospitaes, como de resto por toda a parte, os germens introduzidos com o ar nos nossos pulmões não são mais devolvidos á atmosphera, por occasião do movimento expiratorio, como demonstrou Straus, que verificou pela analyse do ar expirado a não existencia ahi de um só germen. Effectivamente os germens são destruidos, ou antes digeridos, pelas cellulas migratorias do pulmão, e as poeiras mineraes são na maior parte expellidas pela tosse.

O ar tambem transporta poucos germens pathogenicos, e ainda assim não os pode conduzir muito longe com a virulencia propria desses micro-organismos ; virulencia que attenua-se em presença da luz e do oxygenio, que distroem um grande numero de especies.

Destes factos conclue-se que a contaminação pelo ar é muito rara, não sòmente pela quantidade diminuta de germens virulentos ahi contidos, como tambem porque o con-

tagio só pode dar-se a distancias muito pequenas, em um raio muito curto, partindo do fóco de infecção

Sob o ponto de vista da morphologia é esta a proporção de germens encontrados em determinado volume de ar:

Micrococcus..	75 %
Bacillus...	10 %
Bacterium	15 %

Em certas profissões estão os operarios expostos a adquirir *pneumoconioses* resultantes da inspiração de poeiras especiaes, como acontece com os que trabalham em pedra, carvão, etc.

Aquelles que manejam o lixo podem introduzir em seus pulmões, por intermedio do ar respirado, o germen da tuberculose; do mesmo modo que podem adquirir o carbunculo (como ha tantos exemplos) os que trabalham na lã e mesmo nas pelles.

Fóra, porem, d'essas poucas circunstancias especiaes está hoje bem estabelecido que os casos de contaminação pelo ar são raros, ao contrario d'aquillo que se acreditava outr'ora.

Este facto ainda é provado pelos apparelhos registradores, que, entre myriadas de corpusculos — germens, fixam apenas algumas raras bacterias pathogenicas.

Sirva o conhecimento d'esses factos para tranquillisar as populações em tempos de epidemia, ensinando a cada um a conducta prudente a seguir, que é evitar na medida do possivel de approximar-se sem necessidade dos fócos pestilenciaes, sem entretanto hesitar um só momento em soccorrer os atacados, quando os deveres sociaes e os principios de humanidade o exigirem; os que se acharem n'estas condições perigosas, mas nobilissimas, encontrarão na hygiene meios poderosos para neutralisar uma contaminação possivel. E' preciso ser-se prudente, mas não pusillanime.

MICROBIOS DAS AGUAS

SUMMARIO—Insufficiencia da analyse chimica. —Quantidade e qualidade dos germens.— —Experiencias de Pasteur.—Modo de recolher a agua a examinar.—Ensaios preliminares.—Methodo das sementeiras fraccionadas em caldo.—Placas de gelatina.—Methodo de Miquel.—Exame chimico auxiliar do exame bacteriologico.—Aguas de rio.—Agua de alimentação de Pariz.—Aguas dos poços.— Aguas dos esgotos de Pariz.— Sua purificação nos campos de cultura.—Filtração das aguas potaveis.—Desinfecção pelo calor.—Influencia do ar e da luz.—O ozona. —Microbios no gelo; na agua distillada; nas aguas gazozas.—Aguas potaveis e epidemias.—Estudos relativos ao assumpto.

Até bem pouco tempo quando se queria fazer a analyse de uma agua, indagava-se simplesmente qual a quantidade de materias organicas e de saes nella contidos; procurava-se saber tambem se esta agua dissolvia bem o sabão, fazendo espuma e se cosinhava os legumes. Satisfeitas estas condições a agua era declarada potavel; no caso contrario era tida como imprestavel para a alimentação.

A bacteriologia veio mostrar, porém, que uma agua proclamada pura pela analyse chimica pode offerecer os maiores perigos, se contiver germens pathogenicos, que em grande numero de casos fazem da agua o vehiculo que os conduz ao interior do nosso organismo.

É claro que uma agua contendo uma grande quantidade de materia organica (e os microbios são organisados) deverá com razão ser considerada menos sã; mas o inconveniente será muito mais serio se a pres nça de germens pathogenicos fôr demonstrada.

Na especie a qualidade tem mais valor do que a quantidade; sendo na verdade indifferente introduzirmos no nosso tubo digestivo, que contem milhões de bacterias. mais alguns microbios, desde que estes não sejam os vibrões do cholera, ou os bacillos da febre typhoide.

É a Pasteur e Joubert que se devem as primeiras analyses microbianas da agua; todos os processos empregados hoje derivam d'aquelle que em 1878 foi posto em pratica pelos dous experimentadores.

Quando se deseja examinar uma agua, sob o ponto de vista bacteriologico toma o analysta um balão da capacidade de 150 a 300 grammas e, esterilisando-o previamente, enche-o com a agua a analysar.

O professor Roux insiste particularmente sobre a conveniencia de cada um fazer por si mesmo esta operação de recolher agua nos mananciaes, ou no ponto em que deva ser tomada, e nunca confiar na agua remettida, mesmo pelas autoridades; porque são indispensaveis precauções que afastem qualquer possibilidade de contaminação diversa d'aquella que a agua já tinha experimentado; e essas precauções só podem ser tomadas por quem tenha o habito das manipulações bacteriologicas, cuja technica exige a maior pureza, conforme tantas vezes temos repetido no decurso d'este trabalho.

É assim que o vaso deve ser envolvido em papel *buvard* e arrolhado tudo segundo a pratica das esterilisações:

quando o operador tiver de enchel-o o fará contra a correnteza, mergulhando-o bem abaixo da superficie, para evitar tanto quanto possivel as poeiras e os detritos fluctuantes.

Uma vez cheio e arrolhado, será o vaso cercado de gelo para impedir-se a pullulação dos germens existentes na agua, durante o trajecto para o laboratorio.

E de facto a proliferação faz-se com extrema rapidez; para prova ahi vai o quadro, organisado por Miquel, dando o desenvolvimento de germens, segundo a temperatura e em um centimetro cubico da agua do rio Dhuis, que abastece Paris:

HORA	TEMPERATURA	BACTERIAS
12	16 gráos e 6 dec..........	57
1 1/2	19 » » 5 »	143
3	20 » » 9 »	465

De volta ao laboratorio (conservando-se sempre a agua na geleira) faz-se um ensaio preliminar ligeiro para conhecer-se approximativamente a riqueza da agua em microbios, o que facilitará muito a analyse definitiva.

Para isso procura-se uma pipetta graduada, de modo que dê *20 gottas por centimetro cubico.*

Toma-se um centimetro cubico da agua a examinar e mistura se a 99 centimetros cubicos de agua esterilisada, obtendo-se uma diluição de 1 %. Com a pipetta toma-se outro c. cubico d'esta diluição e semeam-se 10 tubos com uma gotta da diluição para cada tubo: os tubos são em seguida collocados na estufa. Tendo-se em vista que em 24 horas desenvolve-se apenas *a quarta parte* dos microbios, um calculo approximado nos fará saber que se *dous germens*

se tiverem desenvolvido em cada tubo, com uma incubação mais longa poderiamos ter 8 germens por tubo; e tendo-se ainda presente que a diluição é *cem vezes* menos povoado do que a agua que lhe deu origem, e que d'esta diluição só foram empregados 10 centimetros cubicos, chega-se ao seguinte resultado:

10 tubos á 8 bacterias sommam 80 germens, que multiplicados por 2 dão 160 para cada centimetro cubico da diluição, ou sejam 16,000 germens para agua a analysar.

Conhecidos estes dados e diluindo-se na mesma proporção, para no fim de 25 ou 30 dias de estufa ter-se apenas um germen, ou mesmo nenhum, por cada tubo de caldo, procede-se ao calculo final, ou enumeração total dos germens encontrados em um determinado volume d'agua, que em summa é o que visa principalmente a analyse bacteriologica d'agua.

Miquel preconisa o methodo chamado mixto e do qual elle serve-se constantemente em suas analyses. É o mesmo processo empregado por aquelle consciencioso bacteriologista para o exame do ar e de que já tratamos no lugar competente. E na verdade é um dos processos mais praticos e de resultados mais seguros.

Entretanto a analyse bacteriologica d'agua não deve andar desacompanhada da analyse chimica, que não póde ser esquecida: esta será um complemento, uma confirmação em muitos pontos, da analyse microbiana.

E assim perguntaremos em primeiro logar ao chimico se a agua é *arejada*, porque certas especies microbianas precisam do ar para viver, e uma agua pobre de oxygenio servio sem duvida de meio nutritivo a microbios aerobios. Nas condições médias de temperatura e de pressão, ou melhor: estando a temperatura a—O—e a pressão barometrica a—760,—um litro d'agua deve conter em média 12 milligrammas de oxygenio dissolvido.

Em Pariz, n'agua do Vanne, só se encontra 10 milli-

grammas. No Sena a quantidade de oxygenio varia conforme o ponto do seu percurso em que a agua é examinada, como se vê do quadro abaixo :

Ponte de Charenton.............	10	milligrammas
Ivry	10	»
Ponte de Austerlitz............	9	»
Chaillot........................	8	»
Saint Denis........................	7	»

Destes algarismos, cujas fracções despresamos, resulta a certeza de que, apezar da enorme agitação que experimenta a agua do Sena, pelo movimento constante de innumeros vaporesinhos e barcos de toda a especie que sulcam o rio, e ainda pelo choque contra as columnas das numerosas pontes e finalmente pelas ondulações de toda a sorte, que concorrem para arejar fortemente as aguas, estas, ao passar por Pariz, recebem um grande contingente de microbios que lhes absorvem o oxigenio.

Portanto uma agua pouco oxigenada terá grandes probabilidades de haver nutrido um bom numero de microbios.

O chimico nos dirá tambem qual o coefficiente de alterabilidade d'agua ; isto é : qual o gráo de rapidez com que o oxigenio desapparece da agua. A agua do Sena depois de 24 horas de repouso e á 33° de temperatura, tem perdido todo o seu oxigenio.

A agua do Vanne, que alimenta parte da população parisiense, comparada com a do Sena ao passar pela grande cidade apresenta em varias epocas do anno o seguinte resultado :

AGUA DO VANNE

25 de Julho...............................	11	miligrammas.
3 de Agosto............................	20	»
25 de Setembro....,.....................	39	»

AGUA DO SENA

24 de Setembro...	10 miligrammas.
1 de Outubro............	0 »
16 de Outubro........................	0 »

A differença desses algarismos explica-se assim : é certo que a agua do Vanne não deixa de conter microbios ; mas ella contem tambem algas verdes que fixam o acido carbonico e desprendem oxigenio, sob a influencia do ar e da luz ; e a acção das algas prevalece sobre a dos microbios. No Sena, pelo contrario não ha algas e por isso em pouco tempo todo o oxigenio tem desapparecido.

O chimico nos informará egualmente sobre a quantidade de materias organicas contidas na agua. Este ponto é muito importante porque as materias organicas servem de alimento aos microbios, ou são ellas proprias outros tantos germens. Cumpre, porem, observar, que os resultados dessas analyses só podem ser comparaveis entre si, quando as pesquizas forem feitas pelo mesmo processo ; para isso o *Comité d'Hygiene* de Pariz estabelece que ellas deveriam ser feitas sempre *pelo processo do permanganato de potassio, em um meio alcalino;* esse corpo reduz-se, oxydando aquellas materias á ebulição.

Pela quantidade de oxygenio roubado ao permanganato de potassio, em cada litro d'agua estabeleceu-se a seguinte classificação :

Agua muito pura.	1 miligramma.
» potavel.................	2 «
» suspeitas.............	3 á 4 »
» má......................	ms. de 4 »

Estes dados são um pouco arbitrarios, não ha duvida ; mas offerecem um *criterium* relativo para julgar-se da má qualidade de uma agua, e na pratica podem bastar.

O chimico nos esclarecerá finalmente sobre a quantidade de ammoniaco, de azoto ammoniacal e azoto nitrico existente na agua. As materias organicas exydadas pelos

microbios dão ammoniaco, cuja presença é uma prova de que no liquido ainda existem culturas vivas. O azoto nitrico é um producto da transformação do azoto ammoniacal oxydado : sua presença serve para determinar o passado da agua. E de facto, a existencia de uma grande quantidade de azoto nitrico indica que trata-se de uma agua polluida, mas que já oxydou-se ; uma quantidade ainda maior prova que a agua em questão proveio dos esgotos. O azoto nitrico é um excellente adubo.

Das analyses feitas nas aguas de fonte que abastecem Pariz e nas do Sena (1) em varios pontos do seu trajecto por aquella cidade, assim como na agua dos esgotos antes e depois da sua depuração nos campos chamados de *épandage*, resultam os seguintes algarismos, relativos á materia organica contida em um litro de qualquer d'aquellas aguas :

ORIGEM DAS AGUAS	MATERIAS ORGANICAS	AZOTO AMMONIACAL	AZOTO NITRICO
Vanne....	2 milligram.	0,0	2 milligr.
Dhuis....	0,1mgr3	0,0	2,mgr5
Sena em Ivry....	0,33	0,0	1,8
Sena em Chaillot....	34	0,0	1,0
Esgoto de Asniéres.	35,8	21,1	5,0
Agua dos drenos.....	1,6	0,0	19,0

A quantidade de germens contidos na agua do Sena varia com a estação e com o lugar em que é apanhada ;

(1) Em Pariz bebe-se ordinariamente agua de fonte (Vanne, Dhuis, etc.) ; a agua do Sena serve principalmente para a lavagem das ruas e só por uma rara excepção é empregada para a alimentação, como succedeu em 1895, cujo verão prolongou-se muito ; de sorte que a administração foi obrigada, durante uns 5 ou 6 dias, a introduzir na canalisação geral, servindo a certos quarteirões, essa má agua.

isto é : segundo é ella recolhida pouco antes, durante, ou depois de sua passagem por Pariz. E' a seguinte a media dos germens encontrados em um centimetro cubico d'aquella agua no anno de 1890 .

ESTAÇÕES	IVRY	AUSTERLITZ	CHAILLOT
Inverno...........	43.500	48.890	91.128
Primavera.........	26.570	33.440	71.845
Outono..............	13.710	41.665	144.650
Verão...............	43.640	53.965	139.070
Media...........	32.530	44.490	111.660

Aqui nota-se o inverso do que se passa no ar : os germens são mais numerosos durante a estação das chuvas, que acarretam para os cursos d'agua os microbios que vão encontrando na atmosphera e no seu percurso pelo solo. Ha tambem um outro factor que intervem, embora de maneira contraria : é o calor que reina durante o verão, que concorre para a pullulação rapida dos germens existentes nas aguas do Sena.

Quanto á agua de fonte de que se abastece Pariz, é esta a quantidade de germens encontrados em um centimetro cubico, nas diversas estações do anno de 1898 :

ESTAÇÕES	VANNE	DHUIS
Inverno.................................	12.000	3.180
Primavera	720	2.125
Verão...	770	635
Outono	505	1.605
Media..................	800	1.820

Ainda aqui nota-se que no inverno é que se encontra maior numero de germens.

Que se deve pensar da agua dos poços ?—Situados em geral perto dos sumidouros e das latrinas das habitações, os poços são facilmente contaminados pelas infiltrações do solo. A agua de tal procedencia deve ser declarada má ; o mais que se pode fazer ou conceder é considerar menos severamente a agua dos poços revestidos de paredes metallicas, que não permittam as infiltrações das circumvisinhanças ; mas ainda assim é preciso sempre restricções na maneira de julgar taes aguas, convindo lembrar tambem que o systema de bombas empregado para extrahir agua dos poços favorece muitas vezes as culturas microbianas.

Outr'ora toda a sordidez de Pariz despejava no Sena, que tornou-se em certos logares uma verdadeira cloaca ; na estação calmosa toda aquella podridão proveniente dos *excreta* e dos detritos de toda a sorte produzidos por uma agglomeração de cerca de 3 milhões de pessoas e um numero correlativo de animaes domesticos, fermentava produzindo o envenenamento dos peixes, que afinal morriam e começavam a boiar na superficie do rio, augmentando-lhe ainda mais a infecção.

Hoje adoptou-se outro systema, o de *épandage* ; as aguas são conduzidas, por meio de uma extensa canalisação fechada e estanque, até um logar afastado da área suburbana, onde ha uns terrenos aridos e improductivos, inteiramente desacompanhados de habitações. Ahi na peninsula de Gennevilliers um systema de comportas reparte convenientemente essas aguas por meio de vallas ou regos, de modo a poder ser a terra bem irrigada pela agua pullnida, que constituindo um excellente adubo, transformou completamente aquelle solo ingrato em fertil terreno de bellas culturas de hortaliças e legumes.—Infelizmente as culturas a que vão aproveitar taes aguas podem-se resentir dessa origem impura e os legumes serem portadores de microbios pathogenicos, o que torna taes productos perigosos, se

tiverem de ser comidos crús, como é a regra para muitos delles.

Quando a agua chega a Gennevilliers contem cerca de *treze milhões* (13,000,000) de germens por centimetro cubico; quando mais tarde, depois de se infiltrar nos terrenos, ella sai pelos *drains* não contem quasi nenhum: ficaram todos no solo.

D'ahi conclue-se que as aguas foram depuradas em alto gráo. A principio ellas continham materias organicas que mais tarde transformaram-se em ammoniaco e depois em azoto nitrico, que denuncia evidentemente o passado d'esta agua, isto é: que ella foi outr'ora a agua impurissima dos esgotos.

Somente depois de purificada, porque como diz o eminente professor Duclaux «o azoto nitrico, quando é só, é o indicio certo de que todas as transformações foram terminadas nas aguas; todas as materias organicas foram queimadas a fundo e a agua adquirio então o seu maximo de pureza e salubridade...». Só depois de assim depurada é que a agua dos esgotos de Pariz é lançada no Sena, para confundir-se finalmente com a do oceano, nas costas da Normandia.

O professor Roux notando a inconveniencia da cultura de legumes adubados com a agua dos esgotos, lembra que seria preferivel fazer nos campos de *épandage* prados artificiaes, ou culturas de forragens, destinadas á criação de animaes proprios para a alimentação do homem.

Então poder-se-ia aproveitar a agua já depurada pelos prados e contendo azoto nitrico em grande escala (que é um excellente adubo) para estrumar as culturas hortelãs: realisando-se assim um lucro de muitos milhões, tudo sob o protectorado da hygiene.

A purificação das aguas de alimentação é muito mais difficil; e quando ellas vêm de um rio ou de um ribeiro é preciso filtral-as.

O filtro para a purificação em larga escala é ordinariamente formado por camadas successivas de cascalho, areia e areia muito fina. Este assumpto tem sido muito estudado, na Europa, principalmente por Carl Fränkel, o conhecido bacteriologista de Berlim.

No começo o filtro não tem grande valor porque deixa passar os microbios; pouco a pouco, porém, os microorganismos vão se depositando na superficie, onde formam uma camada glutinosa, que por si mesmo constitue uma materia filtrante muito bôa, que vai detendo os microbios á medida que elles vão chegando. Entretanto esse bom filtro, com a continuação, não tarda muito a se *colmatar*, por causa do deposito abundante de materia organisada: neste caso é preciso limpal-o, substituindo as camadas superiores, que apresentam então o aspecto de uma lama, ou uma vasa composta de germens.

Uma vez limpo, tem-se um filtro insufficiente nos primeiros dias que seguem o seu funccionamento, para tornar-se bom depois, e por fim colmatar-se outra vez.

Em Nantes fez-se um poço filtrante no meio mesmo do rio Loire, capaz de fornecer uma agua em boas condições, relativamente ao numero de bacterias, como provam estes algarismos que vão abaixo:

BACTERIAS POR C. CUBICO

AGUA DO RIO		AGUA DO POÇO	
Amostra n. 1.....	9.060	Amostra n. 1..........	55
» » 2.....	10.550	» » 2..........	82
Media............	9.850	Media..................	69

Como se vê, o resultado é excellente; mas ha o receio constante de que as cheias venham deslocar as areias das camadas filtrantes e conseguintemente desmanchar o filtro,

Os filtros domesticos apresentam tambem a maior parte dos inconvenientes que acabamos de apontar para os de areia: a colmatação faz-se rapidamente, e no fim de pouco tempo a caixa filtrante, mesmo quando volumosa, torna-se um reservatorio de culturas microbianas impossivel de limpar-se.

O unico filtro bom sob o ponto de vista bacteriologico é o de Chamberland, mas com a condição de ser ensaiado previamente e de ser limpo uma vez por semana, conforme ja foi explicado quando tratamos da filtração de culturas microbianas.

Tem-se procurado tambem desinfectar a agua pelo calor sob pressão, com auxilio de machinas especiaes. E' um processo que pode vir a prestar muito bons serviços, mas cujo preço é muito elevado, sendo os apparelhos, alem de caros, muito delicados e de facil desarranjo.

Tambem pensou-se em purificar a agua por meio da oxydação pelo ozona. Na Hollanda fizeram-se alguns ensaios coroados de successo; o que resta saber é se o systema é economico e portanto capaz de ser utilisado na pratica. Os effluvios electricos produzidos por machinas possantes, desenvolvendo até 100.000 *volts*, fornecem o ozona, que passa pela agua produzindo ahi uma desinfecção segura e efficaz e com a maxima rapidez. Este systema apresenta ainda uma vantagem: é que elle opera tambem a descoloração das aguas de côr carregada, como são, por exemplo, as que provêm dos *polders* da Hollanda.

Quando as aguas são muito carregadas de materias organicas ha necessariamente perda do ozona, que se prende a estas, em vez de agir exclusivamente sobre os microbios que se procura exterminar; d'ahi a necessidade de um maior rendimento na producção do ozona.

A purificação das aguas dos rios, mesmo depois do seu trajecto por uma grande cidade, faz-se por si mesmo; é conhecida a influencia da luz combinada com a do ar sobre a vida dos microbios; algumas horas de insolação

bastam para destruir grandes quantidades de microbios.— D'ahi vem o facto de serem as aguas dos lagos consideradas muito puras; na verdade as aguas do lago de Genebra, que como é sabido, é completamente cercado de cidades e outras povoações menores, são de uma pureza proverbial na Europa. As analyses feitas em taes aguas, especialmente no verão em que a luz viva de um sol magnifico actua durante muitas horas consecutivas na vastissima superficie azul d'aquelle bello lago, não revellam a presença de um só germen em muitos centimetros cubicos da excellente agua.

No gelo os microbios conservam-se intactos, mesmo em suas formas vegetativas; apenas não proliferam; portanto o gelo proveniente de uma agua impura guarda todos os germens que existiam no estado liquido d'agua, que pode assim ser o vehiculo de germens pathogenicos e conseguintemente de contagio ulterior; entretanto convem accrescentar que essas alternativas de fusão e de congelação podem fazer algum mal aos microbios, compromettendo-lhes a existencia.

O acido carbonico sob pressão é nocivo aos microbios; pelo que elles apparecem em pequeno numero na agua artificial de Seltz; isto não quer dizer que as aguas gazozas não possam ser causa de contaminação; apenas os germens existem ahi em um numero muito menor do que na agua que servio para a fabricação de taes bebidas.

A agua distillada dos laboratorios pode ser rica de microbios: ella contem sempre um pouco de ammoniaco, que as bacterias decompõem para tirar d'ahi seu alimento.

São conhecidas e têm sido evidentemente provadas as relações entre as epidemias e a agua potavel: a demonstração do facto tem sido muitas vezes feita, principalmente depois que a bacteriologia constituio-se.

Em taes condições os medicos, os chimicos, os bacteriologistas, são muitas vezes chamados a analysar as aguas de uma localidade. Aconselha o Dr. Roux que cada um evite operar sobre amostras que não tenham sido pessoal-

mente recolhidas por quem tenha de analysar a agua, e isso com as precauções recommendadas no começo d'este capitulo: deve-se recusar terminantemente, diz elle, a agua enviada pelos particulares e pelas municipalidades; porisso que tanto uns como outros não estão no caso de garantir o experimentador contra as causas de erro e até mesmo de mystificação.

E' por este mesmo motivo que Duclaux, o sabio professor de chimica da Sorbonne e eminente bacteriologista director do Instituto Pasteur, recusa systematicamente fazer analyses chimico-bacteriologicas em aguas enviadas ao seu laboratorio; elle entende que o exame geologico é complemento indispensavel dos outros dous, senão o mais importante; e que uma analyse isolada não offerece absolutamente garantias: «é uma verdadeira phantasmagoria,» diz elle.

Primeiramente é preciso fazer-se um estudo da captação d'agua; indagar de onde vem ella, que terrenos atravessa, se ha culturas e habitações visinhas, qual a natureza dos adubos empregados nas culturas, se as ha; é preciso ainda verificar se o perimetro que a lei reserva para a protecção das fontes tem sido respeitado. E' igualmente importante examinar se as dejecções dos moradores visinhos não teem sido arrastadas pelas chuvas, ou se os mananciaes não estão sendo contaminados por infiltração proveniente de cloacas. A canalisação deve ser examinada: elle deve ser estanque, portanto será de ferro e não de barro cosido; e não deve receber a agua da superficie e sim das camadas mais profundas dos reservatorios; estes deverão tambem passar por um exame detido e minucioso, tendo-se bem em attenção a sua alvenaria que póde ser de materia porosa de má qualidade, ou póde estar em más condições de conservação. Este exame deve estender-se á canalisação urbana e aos pequenos reservatorios dos domicilios: tem se visto algumas vezes epidemias limitadas a uma area muito restricta, a um dos lados de uma rua, a um

grupo de habitações, a uma só casa emfim, dependendo de um unico reservatorio.

Nestas circumstancias difficilimo é encontrar-se o germen especifico de tal ou tal outra molestia, como o bacillo de Eberth ou o vibrião de Koch ; entretanto quando depois de feitas as competentes culturas o analysta encontrar muitos microbios liquefazendo a gelatina, ou exhalando máo cheiro, como os que se cultivam nas materias fecaes, está elle authorisado a declarar que *a agua é má* : é a unica affirmação positiva que em consciencia se póde fazer em similhantes condições.

Miquel propõe a seguinte escala de classificação das aguas, segundo o seu contendo em germens, por centimetro cubico :

Perfeitamente puras de		0	a	10	bacterias.
Muito puras............	»	10	»	100	»
Puras......................	»	100	»	1.000	»
Mediocres...	»	1,000	»	10,000	»
Impuras..................	»	10,000	»	100,000	»
Muito impuras.......	»	100,000	para cima.		

Qualquer que seja o numero de microbios encontrados em uma agua, se elles forem banaes, serão por isso mesmo de pouca importancia. Se pelo contrario, em uma agua considerada muito pura, pela sua pobresa em germens, verificar-se entre esses poucos germens a presença de algumas especies pathogenicas, não se deve hesitar em declarar a agua *impropria para o consumo.* Entretanto o exame do terreno é de todos o mais util.

Aliás não se deve procurar esta pureza absoluta na agua que bebemos, porque é bem racional pensarmos que entre os microbios dá-se tambem a *struggle for life* e que na concurrencia vital um bom numero de especies saprophytas impedem o desenvolvimento de outras tantas bacterias infecciosas : o que afinal de contas tem sua utilidade, porque garante o nosso organismo contra uma contaminação possivel.

MICROBIOS DO SOLO

SUMMARIO:—São numerosas as especies microbianas do solo.—Ellas variam com a natureza do terreno.—Contagem dos microbios.—Modo de recolhel-os.—Processos de cultura.—Observações de Muntz e Schlœsing.—Experiencias de Winogradsky.—Fermentos nitrosos e nitricos.—Microbios desnitrificantes.—Observações de Gayon e Dupetit.—Fermentos da cellulose.—Fermentação das estrumeiras.—Fixação do azoto atmospherico pelo solo.—Experiencias sobre as nodosidades das leguminosas.—Bacteroides dessas nodosidades.—Bacillos fixadores de azoto.—Importancia dos microbios do solo.—Polluição das aguas subterraneas.—Importancia da natureza do solo.—Evolução de certos microbios pathogenicos.—Transporte dos microbios pelas aguas de alimentação.

O solo é um grande reservatorio commum, de onde tudo vem e para onde tudo volta. Os vegetaes, os animaes, o homem, obedecem a esta lei e seguem a mesma regra geral, á qual não fazem excepção os microbios, que

tambem voltam ao solo de onde haviam partido; porém voltam quasi sempre augmentados em numero, devido á multiplicação rapida que elles experimentam por occasião de sua passagem pelos nossos intestinos, multiplicação que ainda continúa activamente nas fézes.

O cadaver que é restituido á terra é um vasto meio de culturas microbianas, que proliferam consideravelmente antes de se incorporar ao sólo; de sorte que cada parcella das terras cultivadas ou adubadas com os nossos detritos encerra bilhões de bacterias; e tanto o numero de especies como o de individuos varia com a natureza do terreno.

De facto: nos logares onde abundam os homens e os animaes, com os despojos que os acompanham, triste e indefectivel apanagio da vida animal em commum, não se encontra a mesma flora microbiana que nos terrenos cobertos de florestas impenetraveis e ainda virgens das explorações humanas; assim como é muito differente destas duas, a flora microbiana das terras improductivas arenosas, sem florestas e portanto sem detritos vegetaes.

As especies bacterianas encontradas no solo são: umas saprophytas (e são felizmente as mais numerosas) e outras parasitarias, entre as quaes salientam-se os microbios do tetanos, da septicemia e da suppuração.

Essas especies dividem-se ainda em dois grupos: aerobias e anaerobias, segundo precisam ou não do ar para viver; d'ahi a necessidade de fazer culturas differentes para as duas categorias de microbios, quando se quizer ter uma analyse completa e rigorosa de um terreno.

Como fazer-se a analyse do solo?—Applicando-se pura e simplesmente os mesmos methodos que já conhecemos para a analyse do ar e da agua.

De varios pontos do terreno a examinar tomam-se pequenas porções de terra, misturando-as em seguida umas com as outras. Desta terra assim misturada tira-se uma

quantidade definida em peso, algumas grammas, que junta-se a um determinado volume d'agua esterilisada.

Com este liquido, que nós podemos diluir á vontade, tendo sómente a cautela de notar sempre o numero de diluições e o volume que lhes servio de base, semeam-se tubos ou placas de cultura, conforme a technica já indicada para o ar e para agua, cujos processos de analyse já foram expostos em outra parte, sendo portanto dispensavel repetil-os agora.

Havendo utilidade em conhecer-se a distribuição dos microbios a partir da superficie para a profundeza do solo, pratica-se um corte interessando varias camadas do terreno e recolhem-se diversas amostras. O mesmo resultado obtem-se por meio da sonda de Fraenkel.

Experiencias feitas n'este sentido mostraram que na superficie do solo os microbios são muito numerosos e que vão diminuindo progressivamente á medida que penetra-se nas camadas inferiores do terreno, o qual muito profundamente póde ser até esteril ; dá-se exactamente, em sentido inverso, o mesmo phenomeno que se passa no ar. Aliás tudo quanto sabiamos das aguas de fonte deixava prever este facto.

Querendo-se isolar especies pathogenicas, o mais seguro é inocular as culturas sob a pelle de um animal sensivel á especie microbiana que procura-se, ou de cuja presença sobre o terreno suspeita-se ; em seguida procurar-se-á o microbio no sangue, ou no ponto de inoculação.

Os microbios mais interessantes de estudar são aquelles que desempenham funcções chimicas. Microbios morrem e cahem sobre o solo, formando ahi uma massa organica ; veem outros microbios e decompõem essa massa inerte em ammoniaco, em materias hydro-carbonadas e nos acidos lactico e butyrico, desprendendo tambem acido carbonico e vapores d'agua, que se perdem na atmosphera. O ammoniaco é por sua vez transformado primeiramente em

acido nitroso, depois em acido nitrico e por fim em nitratos.

A decomposição das materias organicas em ammoniaco é obra de um grande numero de especies microbianas; ao passo que a segunda phase —a transformação do ammoniaco em saes nitricos—é trabalhada apenas por um numero muito mais restricto de especies. Em pouco tempo os saes nitricos têm-se transformado em *nitratos*, sobretudo em nitratos de cal; nitratos que constituem o melhor adubo para os vegetaes.

Como se opera essa transformação? — Suppunha-se a principio que ella se passava em presença do solo, que representava então o papel de corpo poroso, ou de *esponja de platina*, como nas experiencias de laboratorio, havendo uma simples oxydação do ammoniaco, que transformava-se em acido nitrico.

Outros explicavam o phenomeno dizendo que o azoto e o oxygenio do ar se combinavam sob a influencia da electricidade, por occasião das tempestades, e que as chuvas favoreciam as transformações; mas se isto fosse exacto muito restricto seria o numero d'essas transformações; além de que nunca pôde-se realisar artificialmente esta experiencia.

A explicação é, porém, outra: a nitrificação é obra exclusiva dos microbios; corre por conta d'estes pequenos seres. Os Srs. Muntz e Schlœsing fizeram a seguinte experiencia: encheram um grande tubo de vidro com terra aravel; depois fizeram passar pelo tubo uma corrente de ar e uma solução diluida de ammoniaco. Pela parte inferior do vidro elles recolhiam nitratos; mas se o tubo era fortemente aquecido, ou se atravéz d'elle fazia-se passar os vapores anesthesicos do chloroformio, a nitrificação não continuava.

Este facto suscitou no animo dos dous experimentadores a suspeita de que os agentes da nitrificação eram

microbios; dirigíram as suas investigações para este ponto e conseguiram isolar os micro-organismos.

E' bom lembrar aos que quizerem reproduzir aquellas curiosas experiencias, que é preciso juntar cal e magnesia, sob a forma de carbonatos ao conteudo do tubo, para que a acção continue; porque a presença do acido nitrico livre é pouco favoravel á vida do microbio. Tambem a solução ammoniacal não deve ser muito rica em materias organicas; n'este caso a acção dos microbios se deslocaria, visto ser-lhes muito mais facil encontrar seu alimento no ammoniaco do que no azoto.

O Sr. Winogradsky abandonando os processos classicos até então seguidos sem resultado pelos seus predecessores e notando que geralmente se operava em meios muito pobres de materias organicas, adoptou a seguinte technica: tomou um pouco d'agua do lago de Zurich, á qual juntou carbonatos de soda e magnesia, indispensaveis ás combinações nitricas; em seguida semeou o seu liquido com um pouco de terra aravel, juntando pouco a pouco sulfato ammoniacal.

Poucos microbios, dizia Winogradsky, se contentarão com um regimen tão frugal, e por este methodo electivo eu eliminarei os microbios banaes, conservando apenas os da nitrificação; assim pensava elle quando imaginou o seu liquido puramente mineral, cuja composição é a seguinte:

Phosphato de potassio.............	0,1
Sulfato de magnesia................	0,05
Chlorureto de calcio................	traços
Carbonato de soda................ ..	0,5
Sulfato ammoniacal..........	0,2
Agua distillada...........	100 grammas

Semeado o liquido, elle obteve culturas, das quaes tirou a semente para um segundo tubo, que por sua vez forneceu-a a um terceiro, e assim por diante até chegar á decima cultura.

Finalmente Winogradsky encontrava em culturas sobre placas quatro ou cinco especies, mas nenhuma d'ellas por si só podia operar a nitrificação ; a conclusão a tirar era que o microbio nitrificante não proliferava na gelatina.

Continuando a estudar attentamente os seus microbios parecia ao experimentador suisso, que elles fixavam-se sobre o carbonato de magnesia, decompondo-o ; phenomeno que se percebia pelo escapamento de pequenas bolhas de acido carbonico. Então elle tomou do fundo do vaso, umas pequenas parcellas de carbonato de magnesia e semeou em gelatina : esta resfriando-se apprehendia os grãos do sal de magnesia ; em redor de alguns d'esses grãos desenvolviam-se colonias, ao passo que os outros não as apresentavam. Winogradsky concluio que onde havia pullulação tratava-se de microbios que podiam viver sobre gelatina, mas que não eram os da nitrificação, e que estes ultimos ficavam talvez agarrados ao carbonato de magnesia. sem se poder desenvolver.

Elle tomou então alguns grãos intactos, semeou-os em um meio apropriado e obteve a nitrificação.

O liquido apresentava-se primeiramente com um aspecto claro ; depois apparecia sobre o carbonato abundante zoogléa, e quando o liquido ia se tornando turvo, observava-se um micro-organismo muito agitado e a nitrificação fazia-se abundantemente.

Com a semente retirada d'ahi elle fazia novas culturas, sempre excellentes e muito prosperas ; porem não obtinha mais a nitrificação completa : obtinha nitratos e mais nitratos, era tudo. Logicamente Winogradsky concluio que a nitrificação tinha duas phases distinctas ; facto verdadeiro e que já tinha sido presentido pelo eminente Duclaux.

Continuando em suas investigações o experimentador sagaz e perseverante conseguio isolar o fermento nitroso do seguinte modo : elle tomava um pouco de terra, fazia

com ella diversas culturas, e em um meio inorganico semeava depois essas culturas sobre *siliça colloidal*, que se prepara assim :—silicato de potassa, com a densidade 1.06—100 centimentros cubicos ; acido chlorhydrico, com a densidade de 1,1—100 centimetros cubicos. Mistura-se e mette-se em um dialysador até o desapparecimento completo do acido chlorhydrico ; concentra-se pela evaporação em um balão e junta-se tres gottas de uma solução saturada de chlorureto de sodio, para que a massa solidifique-se.

Sobre placas contendo essa substancia Winogradsky obteve colonias de aspecto pardacento e affectando formas arredondadas, difficeis de esmagar. Mais tarde a geléa tornava-se liquida : coincidindo com a agitação intensa que notava-se no liquido, appareciam colonias zoogleicas densas, e por fim distinguiam-se cellulas isoladas, munidas de um longo flagello ou chicote apresentando movimentos consideraveis.

Quando, porém, esses organismos revestem a forma mucosa cercando o carbonato de cal, nenhum movimento apresentam ; a sua actividade depende portanto do meio de cultura.

Semeando-se em uma solução mineral consegue-se sempre obter culturas prosperas d'esses micro-organismos ; o essencial é que elles encontrem ahi o seu alimento predilecto, isto é : o azoto, que elles irão procurar no ammoniaco ; ao passo que os elementos hydro carbonados lhes serão fornecidos pelos carbonatos.

E posto que esses curiosos microbios sejam destituidos de chlorophylla, que em presença da luz opera todas essas reacções, graças aos estudos e observações de Winogradsky nós conhecemos hoje o primeiro exemplo de um ser vivo, que por si só, sem a influencia da luz, faz a synthese das materias organicas decompondo a natureza mineral.

Está, pois, achado o élo que faltava na cadeia biologica ; de modo que agora pode-se explicar o cyclo sem fim

da evolução da vida, renascendo sempre de si mesmo, e foi encontrado o ponto de juncção que liga o reino mineral ao vegetal.

Descoberto o *fermento nitrico* tem-se que semear algumas gottas do liquido em que elle existir, em uma solução mineral para obter-se por meio de culturas successivas o *fermento nitroso*, que é um pequeno bacillo cultivando-se em véo e encarregado da transformação dos *nitritos* em *nitratos*.

Os microbios de Winogradsky encontram-se por toda a parte: em todas as terras do globo; apenas elles mudam de forma segundo a natureza do terreno: mas não variam muito e desempenham sempre as mesmas funcções, tanto no antigo, como no novo continente.

O bacteriologista que os descobriu julgou acertado classifical-os assim: *nitrosomonas* ou fermento nitroso do velho mundo (europeus, javanezes); *nitrosococos* ou fermento nitroso do novo mundo; *nitro-bacteria* propriamente dita ou fermento nitrico.

Como se vê, é dos mais importantes o papel das nitro-bacterias no nosso planeta. Em seu labor quotidiano, constante e até ha pouco tempo ignorado, observa o Dr. Roux, esses infinitamente pequenos realisam a maior obra da terra: elles são os encarregados da circulação da materia e da distribuição da vida. Organisando a materia e materialisando a vida elles resolvem o grande problema da evolução: e sem o seu trabalho ingente de todas as horas, sobre todos os pontos do globo, em pouco tempo veriamos o solo tornar-se infecundo, esterilisar-se e estancarem todas as fontes de vida no nosso planeta, que, materia morta, rolaria no espaço, para jamais reviver, como essas estrellas desoladas, astros vivídos, que erram pelos interminos horizontes do infinito.

Ha tambem os microbios da desnitrificação encarregados de transformar os nitratos em ammoniaco. Se em um

caldo em que se tiver juntado *cinco por mil* de salitre, semearmos um pouco de terra adubada e fizermos uma cultura anaerobia, veremos em pouco tempo desprender-se azoto : isto indica que o salitre foi decomposto.

Das experiencias de Gayon e de Dupetit resultou a descoberta do bacillo que produz essa fermentação, que aliás é tambem operada por outros bacillos : mas o de Gayon é que a faz mais activamente.

Cultivado em estado de pureza em um balão contendo salitre, elle roubará a principio o oxygenio do ar ; se porém o forçarem a viver como anaerobio, elle decomporá o salitre para haver o oxygenio componente d'aquelle corpo e deixará o azoto escapar-se.

Uma condição indispensavel, porém, é que na cultura existam alimentos hydro-carbonados nos quaes o germen vá retemperar a sua energia, porque tendo elle de operar as duas phases de uma fermentação, se lhe faltarem as forças, está claro que o microbio só completará a primeira parte de suas funcções, produzindo apenas protoxydo, ou bioxydo de azoto, que desprende vapores hypoazoticos vermelhos, em contacto com o ar. O microbio devolve o ammoniaco á atmosphera.

Essa classe de microbios desempenha um papel muito saliente na vegetação, visto como as plantas precisam do acido azotico ; e o facto é tão conhecido, que na Europa os lavradores regam as suas plantações com este acido diluido sob differentes formas e em combinações diversas.

E' sobretudo nos depositos de esterco que os microbios desnitrificantes pullulam, operando as transformações tão uteis á lavoura. Infelizmente o esterco é mal empregado, porque o ammoniaco que se escapa é inteiramente perdido para as culturas.

Vejamos como se passam as cousas em uma estrumeira que fermenta. A principio ha grande aquecimento do deposito, grande elevação da temperatura, que póde chegar a 80° centigrados ; phenomeno que é produzido por uma

oxydação intensa devida aos microbios, que fixam o oxygenio do ar. Sob a influencia do calor o ammoniaco volatilisa-se e perde-se na atmosphera.

E' preciso, pois, modificar o systema corrente de fazer estrumeiras. Os agricultores (entre nós mais especialmente os horticultores) pretendem que a estrumeira deve amadurecer ou *curtir*—é o termo : isto é conveniente, não ha duvida ; mas esta maturação deve ser presidida pelos microbios anaerobios, que não produzem esse calor tão elevado, quanto nocivo ; porêm operam a transformação da cellulose (de que são compostos os detritos vegetaes) em materia carbonada negra.

Um metro cubico de estrume exposto ao ar desprenderá calor, perderá o seu ammoniaco, tão precioso como adubo pelo azoto que contém, e só depois d'isso se dará a transformação da cellulose.

Entretanto este mesmo metro cubico de estrume conservado ao abrigo do ar fermentará sem calor, a cellulose se transformará do mesmo modo, e si se tiver o cuidado de juntar phosphatos, o ammoniaco se fixará sobre elles, com as maiores vantagens para a agricultura.

Neste ultimo caso a fermentação é anaerobia e é produzida por um outro fermento differente do primeiro ; ahi a cellulose perde o seu hydrogenio e um pouco de acido carbonico ; ha desprendimento de acido carbonico e de formene ou gaz dos pantanos ; e si se retiver o acido carbonico por meio da cal, pode-se utilisar o outro gaz para illuminar os edificios e outras dependencias dos estabelecimentos ruraes. A turfa e o carvão de pedra não têm outra origem.

Winogradsky tambem isolou outros fermentos da cellulose ; um d'elles é particularmente curioso pela especialidade que tem de destruir o canniço dos pescadores.

E' de observação vulgar que as culturas empobrecem o solo, no que diz respeito ao azoto. As leguminosas, fazendo uma excepção á regra geral e a despeito do enorme consumo

de azoto que exige a sua estructura cellular, fertilisam, pelo contrario, os terrenos. Como se explica o phenomeno? Suppunha-se outr'ora que depois do afolhamento as raizes das leguminosas sugavam o azoto na profundeza do sólo, para trazel-o á superficie. A experiencia mostrou, porém, que se o terreno era anesthesiado pelos vapores de chloroformio a supposta funcção era suspensa; não continuava.

Então pensou-se em um microbio. Henzel e Dupon chamaram a attenção dos pesquizadores para as nodosidades existentes nas raizes de certas leguminosas: nodosidades que são constituidas por microbios, tendo a propriedade de fixar o azoto.

O facto demonstra-se assim: faz-se germinar um grão de ervilha n'agua; a ervilha continuará a desenvolver-se até o momento em que se esgotar a provisão de azoto do seu albumen; uma analyse delicada feita nessa occasião provará que a quantidade de azoto fixado é igual áquella que existia anteriormente nos envolucros do germen.

Cultive-se agora um outro grão de ervilha em areia calcinada, e no momento em que o vegetal deixar de desenvolver-se junte-se uma gotta de uma solução contendo um pouco de terra aravel, que a vegetação continuará, ao mesmo tempo que apparecerão sobre as raizes nodulos, contendo os *microbios das nodosidades*.

Isole-se esta bacteria; faça-se germinar nova ervilha ainda em areia calcinada e portanto inteiramente esteril; pique-se a raiz da planta com uma agulha imbebida na cultura da bacteria, que dentro de pouco tempo uma nodosidade se desenvolverá no ponto picado e a vegetação continuará luxuriante. E se a planta tiver duas raizes pique-se uma dellas e deixe-se a outra intacta: a assimilação se fará do lado picado, emquanto que a raiz indemne definhará.

Beyermeck, Prasmoweky e Laurent fizeram muitas experiencias n'este sentido. Segundo esses experimentadores encontram-se aquellas bacterias não especificadas no solo;

mas quando invadem uma especie vegetal ellas se particularisam ; as da *acacia* por exemplo, agirão mal, ou não se fixarão mesmo sobre as raizes da *ervilha*. Tratando-se, porém, de especies visinhas o mesmo microbio se desenvolverá em todas ellas.

O conhecimento d'estes factos suggerio aos agronomos a ideia de trazer para um solo improductivo terra contendo taes germens. Na verdade a questão é muito interessante e merece ser estudada com attenção ; tanto mais quanto já tem-se conseguido resultados animadores em algumas experiencias feitas em pequena escala.

Para terminar este estudo dos microbios do solo, vamos indagar como elles ahi se conservam. Os que dão endosporos, deixados no solo em repouso, ao abrigo da luz e das causas de alteração, podem permanecer lá sem inconvenientes, por um longo espaço de tempo—dezenas de annos —como succede com o esporo do carbunculo.

Os que não dão esporos são mais facilmente destruidos ; mas ainda assim resistem muito, porque são protegidos por uma especie de envolucro. Após oito ou dez mezes os bacillos da febre typhoide e da tuberculose podem ainda apresentar a sua energia e virulencia habituaes.

Estes factos instruem os hygienistas, indicando-lhes medidas salutares de grande valor pratico, com relação ao enterramento de individuos e de animaes mortos de molestias infecciosas. E vem de molde lembrar aqui os interessantes e, já hoje classicos, estudos de Pettenkoffer sobre as relações que ha entre as epidemias e as variações do lençol d'agua subterraneo. E' verdadeira em muitos pontos a theoria geo-hydrica do pranteado professor de Munich, para explicar certas epidemias.

Convém igualmente lembrar que certos microbios antes de se tornarem pathogenicos, fizeram uma estadia no solo, onde muitos d'elles experimentam uma especie de transformação que modifica a sua maneira de agir sobre os organismos superiores, quando estes vão servir-lhes de

habitat, como succede, por exemplo, na *febre intermittente palustre* e na *coccidia*.

Esta ultima é uma molestia propria do coelho e é devida a um parasita que produz no figado d'esses animaes umas lesões bem caracteristicas, traduzindo-se por pequenas manchas ovaes, esbranquiçadas e constituidas por um accumulo de puz. Pois bem : este *coccidium* injectado de qualquer maneira que seja não reproduz a molestia ; mas passando primeiramente pelo solo, onde soffre a transformação a que alludimos, é capaz de contaminar centenas de coelhos, os quaes entretanto não transmittem directamente a molestia entre si.

São questões da maior relevancia e que devem prender a attenção dos homens da sciencia, especialmente dos hygienistas, que devem ter bem presente que o solo é o principal reservatorio das aguas de que nos servimos para a nossa alimentação : e conforme já vimos, é por intermedio das aguas, e quasi nunca pelo ar, que a maior parte das molestias epidemicas se transmitte á distancia : portanto, debaixo d'este ponto de vista é um estudo digno do maior apreço por parte das authoridades sanitarias e das bacteriologistas.

BACTERIAS CHROMOGENIAS

SUMMARIO — «Micro-bacillus prodigiosus»: sua diffusao e sua cultura sobre os diversos meios. — Formação da materia corante; propriedades d'esta materia.—Raças do bacillo sem pigmento.—Pleomorphismo do *bacillus prodigiosus*. — Bacillo vermelho de Kiel.—Bacillo pyocyanico.— Coloração azul dos pannos dos curativos.— Pyocyanina.— Culturas. — Propriedades da materia corante; funcções chromogenias.— Diversas raças do bacillo pyocyanico.— Acção sobre os diversos meios.—Molestia aguda e molestia chronica.— Veneno pyocyanico.— Vaccinação dos coêlhos.— Bacillo pyocyanico e carbunculo. — BACTERIAS PHOTOGENIAS.

E' dos mais vulgares, especialmente no ar, o *micro bacillus-prodigiosus*, que cultiva-se á temperatura ordinaria sobre quasi todos os meios, porém de preferencia sobre os amylaceos.

Bellas culturas do bacillo observam-se na clara d'ovo, no pão, no pão azymo, nas farinhas humidas, etc.

No anno de 1840 observou-se em Pariz uma verda-

deira epidemia d'aquelle bacillo na farinha de trigo, causando espanto geral entre os padeiros.

Uma cultura do «bacillo prodigioso» dá uma coloração vermelha muito caracteristica, excepto quando é feita sobre gelatina, onde a materia corante só apparece na superficie e com um matiz menos vivo ; a falta de oxygenio no fundo do vaso explica a auzencia do bacillo n'aquelle ponto, onde veem-se apenas uns grumos cahidos da superficie. Nos caldos ainda nota-se o mesmo phenomeno e pelos mesmos motivos ; mas nas batatas a coloração apresenta-se com todo o seu vigor e intensidade.

Examinando-as ao microscopio notar-se-á que nas culturas novas os microbios são muito pequenos : não excedem de 1 a 2 millesimos de millimetro e as suas extremidades são arredondadas ; esta disposição ultima persiste ainda quando, com os progressos da idade, o bacillo se alonga. No estado anaerobio elle desenvolve-se sem dar a coloração que lhe é peculiar.

Por mais viva que seja a coloração, esta não é percebida ao microscopio : a materia corante está contida nas cellulas, sob a forma de pequenos grãos, que abandonam o seu envolucro quando a cellula envelhece ; mas a tinta não se diffunde e nem é soluvel na agua, dissolvendo-se, pelo contrario, no alcool, no ether e no chloroformio.

A tinta que provem da materia corante do *bacillus prodigiosus* apresenta um vermelho vivo, com propriedades analogas as d'aquellas que provêm da anilina, que são obtidas de uma leuco-base incolor, que manifesta a coloração toda a vez que se acha em presença de um acido ; como exemplo temos a fuchsina que é o acido chlorhydrico combinado com a rosanilina, ou melhor : o chlorhydrato de rosanilina.

Se juntarmos um alcali a uma solução da materia corante do «bacillo prodigioso» a tinta resultante d'esta combinação altera-se e toma a côr amarella. Um acido, pelo

contrario, avivará a côr primitiva, deixando escapar vapores ammoniacaes. A tinta é capaz de colorir os tecidos vegetaes e animaes, porém é pouco resistente e desbota quando exposta ao sol: tambem ainda não se fez um estudo industrial do seu processo de extracção, de modo a poder ella entrar na pratica da tinturaria.

O bacillo póde perder as suas qualidades chromogenias: verificou-se o facto cultivando o microbio sobre batatas, a 38 gráos de temperatura. Continuando-se n'estas condições as culturas em gerações successivas, um experimentador paciente chegou a obter uma raça incolor, apezar da presença do ar; mas submettido á temperatura ordinaria o bacillo apresentou novamente a sua materia corante.

Wasserzug conseguio uma raça incolor fixa, effectuando culturas successivas em caldo assucarado: o facto é interessante porque se o agente pathogenico estiver na materia corante do microbio pode-se, por aquelle processo, chegar a supprimir a sua toxidade.

O «micro-bacillo prodigioso» é pleomorpho e tem sido descripto ora como *coccus*, ora como *bacillus*. De facto, ás vezes elle reveste fórmas bacillares muito longas, até mesmo formas espiraes; é assim que Wasserzug cultivando-o em caldo ligeiramente acidulado obteve (é certo que com alguma lentidão) a forma bacillar, que cada dia alongava-se mais. O caldo era acidulado com uma solução a 4% de acido tartrico. Nos filamentos ha alguma mobilidade, que se consegue perceber no campo do microscopio. Em todo o caso é preciso manter as culturas em um meio acido, mudando uma vez por outra o liquido, porque aquelles microbios secretam ammoniacos simples e compostos que vão alcalinisando o meio, e n'este caso elles tomam a forma redonda.

Se durante alguns minutos aquecermos as culturas a uma temperatura de 56°, repetindo a operação quatro ou cinco vezes, a nova raça fixar-se-á definitivamente na forma

que tiver revestido. A mudança de forma operando-se por passagens successivas nos dará a chave da theoria do transformismo, pergunta o Dr. Roux aos biologistas?

Observam-se ainda outras transformações do *prodigiosus*, sob varias influencias; ha a forma dita de soffrimento, que elle reveste nas culturas envelhecidas ou misturadas com antisepticos. N'esta forma de involução o germen apresenta o aspecto de uma cellula inchada, intumescida, que o desfigura aos olhos do observador habituado a examinal-o em suas condições normaes.

Em geral o «bacillo prodigioso» administrado em pequenas doses não é pathogenico. Torna-se pelo contrario, perigoso em grande quantidade, ou quando a sua virulencia tem sido exaltada por passagens successivas.

Tambem póde elle servir para reforçar a acção de outros virus. Roger lançou mão d'este germen para exaltar a virulencia do *carbunculo symptomatico*: com o auxilio das duas injecções associadas elle conseguio matar coelhos que tinham-se mostrado refractarios aos dous virus agindo isoladamente. A cultura do bacillo morto produz o mesmo resultado.

O *bacillo de Kiel* foi descoberto na cidade d'aquelle nome, em cujas aguas é elle encontrado em grande abundancia. E' uma bacteria banal que cultiva-se bem em quasi todos os meios, dando bellissima coloração vermelha.

Cultivado em caldo elle apresenta o aspecto de pequenas estrias moveis, que vão mais tarde tornando-se fixas. Liquefaz a gelatina, tingindo-a de vermelho. Em batata dá culturas muito bonitas, assim como em agar-agar. A materia corante é soluvel na agua, no alcool, no ether, no chloroformio e no acido acetico. Ella é analoga a do bacillo prodigioso e apresenta as mesmas reacções; como aquella muda de côr em contacto com os acidos e com as bases. Exposto á luz o bacillo perde pouco a pouco a sua pigmentação até ficar incolor.

Lameul compoz um meio artificial no qual o microbio dá o *maximum* de sua materia corante. Tudo quanto dissemos sobre as reacções chimicas e tintas do bacillo precedente pode-se applicar á materia corante do bacillo de Kiel.

A *torula rosea*, muito espalhada no ar, approxima-se mais dos « levêdos » e como estes reproduz-se por meio de rebentos; entretanto ella não preside a nenhuma fermentação e perde a sua côr rosea em cultura anaerobia.

As *sarcinas* são bacterias que vivem no ar e na agua e encontram se em grande abundancia no tubo digestivo, especialmente no estomago do homem. Apresentam em geral a côr amarella e seus diversos matizes; o ar aviva a coloração propria de cada uma das variedades.

O *bacillus pyocyanicus* é um microbio que se encontrava outr'ora com muita frequencia nas salas de cirurgia dos hospitaes produzindo o *puz azul* dos curativos, curioso phenomeno que tanto intrigava os cirurgiões antigos, que o reconheciam não somente pela côr, como tambem pelo seu cheiro caracteristico. Antes do emprego dos antisepticos era commum o puz azul, que acreditava-se ter sido secretado pelo doente; e até alguns praticos viam n'essa complicação microbiana um excellente symptoma de feliz presagio para o paciente!

Observando-se, porem, que fóra do contacto com o doente os pannos e fios dos curativos contaminados transmittiam ás compressas limpas uma especie de contagio, continuando-se a notar as manchas azues, occorreo a ideia de que talvez fosse um microbio, como de facto é, a origem do singular phenomeno.

Os estudos começaram pelas propriedades chimicas do puz azul. Tratando os pannos pelo chloroformio, Pordos obteve alguns crystaes e isolou uma substancia corante — a *pyocyanina*, comportando-se chimicamente como as materias corantes vegetaes basicas, como é por exemplo, a tintura de tournesol.

Em seguida Gessart procurou o microbio e conseguio isolar um pequeno bacillo desenvolvendo-se no caldo, em gelatina, gelose e em geral nos meios ligeiramente alcalinisados. Semeado pelo processo das estrias sobre agar aquelle germen diffunde sua materia corante pela massa de gelose, que toma uma coloração azul esverdeada. No caldo essa coloração pende mais para o amarello e o microbio cultiva-se algumas vezes em véo; tornando-se a cultura incolor, se lhe falta o ar.

Quando a materia corante é tratada pelo chloroformio, vê-se no liquido uma camada fluorescente esverdeada; isto significa que o microbio tem mais de um pigmento. Cultivado em albumina só obtem-se mesmo esta materia fluorescente, e repetindo-se a cultura muitas vezes, o microbio perde a faculdade de secretar a pyocyanina.

Chimicamente esta nova materia corante offerece os mesmos caracteristicos da *fluoresceina*; mas se collocarmos a cultura albuminosa em um balão com um pouco de peptona o microbio passará a fabricar a pyocyanina, que nos parecerá mais azul do que de ordinario, e um pigmento tirando a verde, que pela oxydação torna-se pardacento. O meio por excellencia para a cultura d'este microbio é um caldo glycero–peptonisado a 5%, ao qual junta-se agar em dose sufficiente para que o substrato adhira ás paredes do vaso.

A pyocyanina obtem-se facilmente tratando-se uma cultura em caldo, ou gelose pelo chloroformio; basta deixar o chloroformio em contacto com a cultura sem agital-os. O chloroformio tinge-se de azul e pela evaporação abandona a *pyocyanina*, que apresenta-se sob a forma de longas agulhas azues.

A pyocyanina exposta ao ar oxyda-se e dá a pyoxanthose, emquanto que o pigmento verde que se obtem nas culturas em que entra uma peptona glycosada, em presença do ar torna-se pardo.

Em summa, variando-se as condições da cultura, ou melhor : submettendo-se á oxydação os productos de secreção do microbio, obtem-se cinco pigmentos elaborados da seguinte forma :

I Caldo.......... ....pyocyanina
II Albumina .. ..pig. fluorescente verde
III Solução peptonisada............ (pyocyanina e pigmento
  Glycerina —gelose.............. (verde.
IV Peptona glycosada... ....pigmento verde.
V Productos pardacentos de oxydação.

Gessart creou, portanto, varias raças do bacillo pyocyanico : a raça—**A**—completa, criada em caldo, dando a *pyocyanina* e o *pigmento verde fluorescente*. Aquecida a cultura a 57° de temperatura, só apparece o pigmento fluorescente verde proprio da raça—**F**—em que transformou-se aquella primeira raça. A raça—**P**—dá a pyocyanina só ; mas aquecida a 57° produz uma raça nova chamada—**R S**—que não dá materias corantes. Em vez de aquecer as culturas a 57° póde-se fazer passal-as repetidas vezes pelo organismo do coêlho, fixando-se por este processo as diversas especies ou raças do bacillo.

Guignard e Charrin conseguiram modificar a morphologia do *bacillus pyocyanicus* juntando alcool e acido borico ao caldo : por este meio elles obtiveram formas mais longas, que voltam entretanto á morphologia dos *cocci* quando as culturas ficam velhas.

Das experiencias de Charrin resulta que o bacillo pyocyanico não é perigoso quando procede do ar ou da agua ; mas quando elle tem a sua origem no puz é um microbio virulento, cujo poder toxico augmenta por successivas passagens atravez do organismo do coelho, tornando-se mortal na dóse de algumas dezenas de centimetros cubicos.

Injectado em dóses menores sob a pelle de pequenos

animaes, elle dá origem a uma molestia chronica, que no fim de duas ou tres semanas traduz-se pela paralysia de uma ou mais patas do animal; paralysia que póde augmentar progressivamente até matal-o, ou então retroceder e o animal curar-se. Quando apparece a paralysia não se encontram mais os microbios no sangue. Depois da morte encontra-se degenerescencia amyloide dos rins, infarctus ou um rim pequeno contrahido, ao passo que o coração esquerdo é sempre hypertrophiado.

O microbio elabora, de facto, uma substancia toxica, da qual, segundo parece, origina-se a paralysia. A materia corante azul é inoffensiva. Retira-se a substancia toxica de culturas vivas ou mortas, por meio de filtração sobre a vela Chamberland; esta substancia injectada em pequenas dóses confere uma especie de immunisação e o serum dos animaes assim vaccinados parece ter uma acção preventiva contra a aggressão dos microbios.

No homem o puz azul é hoje rarissimo por causa da applicação systematica dos processos antisepticos nos curativos cirurgicos.

Ao contrario das affirmativas dos cirurgiões antigos, resulta das observações clinicas modernas que o puz azul apparecendo em grande quantidade em um doente, só lhe póde ser nocivo.

O professor Bouchard poz em evidencia o antagonismo d'esse germen com o microbio do carbunculo, injectando ambos os productos em pontos visinhos, sob a pelle de coêlhos: 12 sobre 16 d'esses animaes inoculados d'aquelle modo resistiram.

Outros experimentadores (Blavametchisky) notaram que as duas bacterias eram envolvidas pelas cellulas, quando injectadas no olho do coêlho, de modo que não podiam desenvolver-se; mas verificaram tambem que por este meio não consegue-se a immunidade dos animaes, que continuam a ter o mesmo gráo de receptividade.

Semeando-se os dous germens em uma boceta de Petri e fazendo-se estrias, em um sentido com o germen pyocyanico, e em outro com o do carbunculo, nota-se que nos pontos de intersecção ha linhas que o germen do carbunculo não transpõe.

O bacillo pyocyanico desenvolve-se em *crescente* e dá um cheiro especial, que tem a singularidade de impedir o desenvolvimento do microbio do carbunculo, quando ambas as culturas são collocadas uma ao lado da outra, em uma camara humida.

Bacterias Photogenias

Ao terminar este capitulo parece-me de utilidade dizer algumas palavras, a titulo de informações complementares, sobre a propriedade que têm certos microbios de luzir na obscuridade.

Encontra-se a phosphorescencia em varias especies microbianas. Foi Pflüger quem notou primeiramente (1875) que os clarões emittidos pela carne do bacalháo fresco (Macé) eram devidos ao desenvolvimento de um certo germen, e que este micro-organismo dava origem á phosphorescencia que tão frequentemente nota-se no mar do Norte.

Em 1878 essa especie recebeo de Cohn o nome de *Micrococcus Phosphoreus*, germen que tambem tem sido encontrado no salmão e em outros peixes.

Algumas dessas curiosas especies desenvolvem-se na carne. Nuesk refere que em poucas horas toda a carne de um mesmo açougue ficou contaminada; entretanto não é só na carne, ou no peixe, que estes micro-organismos desenvolvem-se: a gelatina é para elles um bom meio de cultura [1] e na agua salgada elles vivem durante muito tempo.

---

(1) Uma tarde do mez de Dezembro de 1895, quando trabalhavamos no laboratorio do professor Roux, em companhia de outros colle-

O ar é necessario á producção da phosphorescencia ; na auzencia do oxygenio ella não se faz. As culturas feitas na obscuridade, ou em plena luz, são igualmente phosphorescentes ; isto significa que o facto de ter sido cultivado em presença da luz não influe para que o microbio perca a propriedade de luzir no escuro.

As chronicas medicas da antiguidade referem o phenomeno observado em certos individuos, cujo suor luzia na obscuridade : o phenomeno era sem duvida nenhuma devido a alguma bacteria luminosa contida no suor, ou n'elle depositada pelo contacto com as roupas contaminadas por qualquer maneira.

gas, já sendo muito escuro e não estando ainda accêsos os bicos de gaz entrou o professor Chantemesse com um vaso de cultura do «microbio phosphorescente» envolvido em um jornal e desembrulhou-o em nossa presença, causando surpresa a todos o clarão que partio do vaso de cultura. A intensidade era tal que cada um de nós pôde ler um trecho do jornal, á luz d'aquella curiosa lampada.

CARBUNCULO BACTERIDIANO

SUMMARIO—Molestias carbunculosas dos animaes.— Pustula maligna do homem.— O carbunculo é inoculavel.—Commissão do Eure e Loire.— Experiencias no coelho, no cobayo e no rato.—Autopsia de um animal carbunculoso. — Bacteridia carbunculosa ; sua descoberta.—Culturas sobre os diversos meios.—Esporos : condições para a sua formação.— Propriedades dos esporos.—Bacteria asporogenia Receptividade dos diversos animaes para o germen.

Sob o nome generico de carbunculo confundiram-se outr'ora varias affecções, taes como a septicemia, as gangrenas, as infecções putridas e outras.—Chabert, professor da Escola Veterinaria de Alfort, foi o primeiro que procurou metter um pouco de ordem n'esse chaos, distinguindo tres formas de carbunculo, o que já não era pouco. Na realidade ha duas molestias distinctas. Por ora vamos nos occupar com o *carbunculo bacteridiano*, aquelle que ataca com frequencia o boi, o carneiro e o cavallo.

— No boi a molestia manifesta-se com grande intensidade e rapidez : o animal fica triste, cessa de comer, incha-se-

lhe o ventre e dentro de pouco tempo morre quasi que fulminado. O cavallo apresenta os mesmos symptomas prodromicos, tem colicas, os seus pellos cahem á menor tracção e o animal morre tambem em breve espaço de tempo. No carneiro a molestia caminha ainda com maior rapidez; e, sem que ninguem suspeite a existencia da menor indisposição, no dia seguinte são encontrados mortos nos curraes ou nos estabulos, 10, 20, 30 animaes!

Os pastores sabiam que o mal era contagioso e que os individuos que manipulavam as carnes de um animal carbunculoso, tendo qualquer arranhadura ou escoriação nas mãos, viam desenvolver-se nos pontos escoriados um edema particular com uma insignificante vesicula, que era seguida de uma infecção geral, traduzindo-se por phenomenos graves, que terminavam ordinariamente pela morte em 36 ou 48 horas;—era a *pustula maligna*, molestia temivel e que é muito commum em toda a parte onde existe o carbunculo.

A autopsia de um animal carbunculoso offerece ás vistas do operador um phenomeno que prende logo a attenção: —vem a ser o grande desenvolvimento do ventre (estomago e intestinos) que transudam uma espuma sanguinolenta. O baço attinge proporções enormes, chegando a adquirir quatro ou cinco vezes o seu volume normal e torna-se tão molle que tem antes o aspecto e a consistencia de uma polpa. Esta lesão é caracteristica e deu logar a que o carbunculo fosse chamado tambem *sangue de baço*, denominação pela qual é conhecida a molestia entre os criadores, em França.

O sangue apresenta alterações especiaes: coagula-se mal, é negro, viscoso e adhere aos dedos. Na base do coração encontram-se pequenos fócos hemorrhagicos, e nos rins grande congestão; de sorte que as urinas mostram-se sanguinolentas, sobretudo nos carneiros, que apresentam o *pissement de sang*, como chamam os pastores francezes a este signal, que lhes serve para diagnosticar com ante-

cedencia a molestia em animaes que ainda não têm os outros symptomas caracteristicos.

Na França era o carbunculo muito vulgar, especialmente em Beauce, onde fazia cada anno grandes estragos: só ahi calculava-se em *seis milhões* de francos o prejuizo annual dos criadores. Estes, alarmados com aquellas perdas tão consideraveis, nomearão uma commissão de pessôas julgadas competentes para estudar o mal; foi essa commissão conhecida na historia do carbunculo por *Commissão do Eure e Loire*, que em 1852 transportou-se a Pariz afim de ouvir o parecer de Rayer e Davaine.

Fizeram experiencias para saber se o carbunculo era uma molestia, isto é: uma entidade morbida especifica, ou se derivava de causas multiplas e diversas; e com este intuito elles inocularam bois e fizeram passagens dos bois para os carneiros e d'estes para o cavallo. Inocularam ainda coêlhos, cobayos e ratos com productos pathogenicos extrahidos da *pustula maligna* do homem, molestia n'esse tempo muito commum n'aquelles logares. A commissão tendo sempre encontrado o carbunculo após aquellas inoculações concluio que tratava-se de uma molestia unica. Já era um progresso no estudo da questão.

Em que condições fazia-se a contaminação?—A commissão fez cohabitar carneiros sãos com os doentes ou com cadaveres carbunculosos: a transmissão não se dava; logo o virus não era *volatil*, segundo a expresssão d'aquella epoca. As inoculações eram feitas com sangue, polpa das orgãos, serosidade, etc e reproduziam sempre o carbunculo.

Logo depois das inoculações ou mesmo algumas horas mais tarde nada apresentavam os animaes de anormal, até que apparecia um edema circulando o ponto inoculado. A partir d'esse momento os ganglios intumesciam e ficavam dolorosos, sobrevinha em seguida a febre e terminava tudo com a morte, que não tardava.

A autopsia revelava o edema especial que circundava

o ponto inoculado, de cujos tecidos sahia um liquido claro com estrias sanguinolentas e de consistencia gelatinosa. Os ganglios eram tumefactos ;os intestinos congestionados : o baço enorme e o figado negro.

Entretanto no carneiro o edema peripherico falta muitas vezes ; no homem, porém, nunca deixa de apparecer. N'aquelles animaes a bexiga contem urina sanguinolenta, mas os pulmões nada apresentam de anormal.

O exame microscopico do sangue, feito com um augmento de 300 a 400 diametros, deixa ver os globulos vermelhos amontoados em tulhas irregulares e não reunidos em pilhas, como no estado normal. Nos espaços livres notam-se pequenos bastões (*bastonetes*) transparentes, duas ou trez vezes mais longos do que o diametro dos globulos, não raras vezes reunidos dous a dous, pelas extremidades.

Davaine e Rayer viram estes bastonetes em 1850, e deram-lhes a denominação de *bacteridia do carbunculo*, chamando a attenção ao mesmo tempo para a sua immobilidade e transparencia.

Pollender estudando o sangue de uma vacca carbunculosa no correr do anno de 1855, encontra os mesmos *bastonetes*, comportando-se como formas vegetaes e dando as mesmas reacções histo-chimicas ; mas elle nenhuma conclusão soube tirar d'esta sua observação.

Dous annos mais tarde (1857) Brauell verifica a presença dos *bastonetes* no sangue de animaes carbunculosos, muito tempo antes da morte dos mesmos animaes ; sendo certo que os bastonetes augmentavam na razão directa da intensidade da molestia e ainda depois da morte. N'esse momento aquelle observador assignala-os como tendo adquirido movimentos, quando na verdade elle os confundia com o *vibrião septico*, passado do intestino para o sangue. Este facto observa se sempre que um experimentador pouco attento procura inocular o carbunculo servindo se do san-

gue de um animal em putrefacção: elle consegue apenas inocular o microbio da septicemia.

Em 1863 Davaine lê perante a Academia de Sciencias, de Pariz a celebre memoria em que elle declara que o «carbunculo é uma molestia especifica, causada pelo desenvolvimento de um organismo particular no corpo da victima.» E como prova, elle accrescenta que o carbunculo não podendo passar á placenta, o feto conserva-se indemne quando a mãi é atacada do mal; e mais: que o sangue d'esta inoculado, reproduz sempre o carbunculo; ao passo que nenhum resultado se consegue com o sangue do feto.

Esta allegação de Davaine não é rigorosamente exacta: estudos mais aprofundados fizeram ver posteriormente que algumas vezes (bem raras, é verdade) encontra-se o bacillo no sangue do feto.

Jaillard e Leplat combateram as doutrinas de Davaine argumentando com uma serie de experiencias por elles feitas, em que commetteram evidentemente o erro de inocular a septicemia por passagens successivas de uns para outros animaes, os quaes morriam todos. Elles não encontravam os *bastonetes*, mas tambem não se preoccupavam com os *vibriões*. Era debalde que Davaine mostrava aos seus contradictores os seus erros, fazendo-lhes ver pelo exame cadaverico dos animaes por elles inoculados, que as lesões encontradas não eram de modo algum as do carbunculo.

Vieram novas objecções, affirmando os antagonistas de Davaine que a causa do carbunculo não era os bastonetes e sim os principios alterados do sangue, as materias albuminoides, etc.

Estava a questão n'este pé quando Koch conseguio fazer culturas successivas no humor aquoso do olho, reproduzindo o carbunculo na 4ª ou na 5ª cultura fóra do sangue.

Afinal, em 1877, veio Pasteur e resolveu definitivamente o problema, matando a questão. Elle estudou profundamente o assumpto e como chimico fez culturas suc-

cessivas muito puras, em urina esterilisada, em caldo e em agua de levêdo ; apresentou finalmente um microbio aerobio podendo-se cultivar fóra do organismo e tendo um aspecto differente do germen encontrado no corpo dos animaes.

Pasteur demonstrou que quando cultivado ao ar o microbio do carbunculo dá *endosporo;* que o mesmo germen póde viver em uma temperatura de 18 a 40 gráos ; mas que a temperatura que mais lhe convém está comprehendida entre 33 e 38 gráos ; que se a temperatura desce a 14° a esporulação não se faz mais e as formas vegetativas tornam-se monstruosas ; que finalmente a 42° elle ainda vive, sem dar, porém, espóros. No corpo dos animaes os endosporos não se formam á falta de ar.

A bacteridia filamentosa morre entre 55 e 57°, ao passo que os espóros resistem até 88°, sendo necessario para matal-os, que elles fiquem sob a acção d'aquella temperatura durante 15 minutos. A' temperatura de 98° a morte sobrevem rapidamente.

No vacuo, immergidos no alcool ou nas soluções antisepticas, os espóros ainda resistem. Continuando suas experiencias, Pasteur cultivou-os em meios variados e mostrou que no sangue oxygenado os bacillos dão espóros e que o oxygenio sob pressão, que mata as formas vegetativas, deixa os espóros intactos.

Elle ainda demonstrou que os germens mais bellos são os que se obtêm em culturas feitas no humor aquoso ; sendo certo que o bacillo prolifera igualmente bem nos outros meios solidos ou liquidos.

Em tubos de gelatina, semeado por picadas elle dá filamentos, que, partindo perpendicularmente do eixo da picada para a peripheria do vaso, tomam o aspecto de uma escova de limpar os tubos dos cachimbos, liquefazendo ao mesmo tempo a gelatina.

A gelose preparada com caldo de carne sem peptona é

um bom meio de cultura para o bacillo. Sobre batatas as culturas são espessas, a leguminosa ennegrece e a bacteria vive á custa do amidon, que ella transforma em assucar e depois em acidos, os quaes por sua vez devem ser neutralisados com o carbonato de cal.

Algumas vezes succede que em certos meios a cultura filamentosa não dá espóros, sem que se saiba a razão d'isso. Pasteur notou que em culturas velhas sobre gelatina a bacteridia perde a propriedade de formar espóros. Semeando-se caldo com um pouco de sangue carbunculoso e expondo-o a uma temperatura de 42°,5 a bacteria desenvolve-se, mas não dá espóros; apenas nota-se no interior do bacillo uns pontos brilhantes, chamados *microspóros, ou falsos espóros* de Chauveau, que nada têm de commum com os verdadeiros espóros. Semeados de novo esses filamentos em um meio aquecido a 33°, que é a temperatura *optima* da bacteridia, obtêm-se novos espóros; mas para obter-se definitivamente a *bacteridia asporogenia*, isto é: privada da propriedade de esporular, deve-se lançar mão do processo moderno do Dr. Roux, que recommendamos de preferencia a outro qualquer.

Consiste o processo no seguinte: divide-se por um grande numero de tubos de ensaio (de 36 a 50) caldo de vitello peptonisado e ligeiramente alcalinisado, á razão de 10 centimetros cubicos por tubo. Os tubos são divididos em varias series de 10 tubos cada uma, levando a numeração 1, 2, 3, 4...10. Faz-se uma solução de acido phenico a 1% (sem alcool) e deita-se em cada tubo uma certa quantidade desta solução phenicada, em progressão ascendente, a começar do primeiro tubo, de modo que o conteudo de cada um corresponda á seguinte tabella:

N° 1	0,c.c.20
N° 2................	0,c.c.40
N° 3............	0,c.c.60
N° 10....	2,c.c.00

Isto quer dizer que cada tubo conterá respectivamente 2, 4, 6,....20/10,000 de acido phenico. Os tubos são arrolhados com algodão, sendo ainda fechada á lampada a extremidade que fica acima da bucha de algodão, para evitar-se a evaporação do acido phenico durante a esterilisação no autoclave. Terminada esta e depois de resfriados os tubos, cada um delles é aberto e semeado com uma gotta de sangue carbunculoso e collocado na estufa, á uma temperatura de 33° a 37°, havendo antes a cautela de cobrir os tubos com um barette de borracha.

Tempos depois, 10 dias mais tarde, examina-se a cultura e ver-se-á então que alguns tubos não apresentam nenhuma pullulação: são justamente os de numero 7 a 10, onde é mais forte a proporção de acido phenico; os de numero 1 a 3, contêm bacterias e espóros; e os intermediarios: 3, 4, 5, 6, pódem apresentar bacteridias, mas nunca espóros.

Entretanto é preciso operar sobre um grande numero de series, porque nem sempre as cousas passam-se assim; os processos de preparação da bacteridia asporogenia são todos muito falliveis, sendo entretanto este que descrevemos, o melhor e o que tem dado resultados mais seguros. Além disso a propriedade de tornar-se asporogenia varia um pouco, como demonstraram Arnould e Surmont, com a procedencia da bacteria.

Elles conseguiram facilmente tornar asporogenia uma bacteridia proveniente do Instituto Pasteur; ao passo que nada conseguiram com uma outra por elles colhida, de um caso de carbunculo humano.

Para verificar-se a existencia dos espóros obtidos nas condições acima expostas não basta o microscopio: é necessario aquecer-se uma parte da cultura a 65°, de maneira a matar as formas vegetativas. Inocula-se depois o liquido; si o carbunculo reproduzir-se é que ahi ha espóros.

O *bacillus anthracis* póde ser dado esperimentalmente, pela via hypodermica ou mesmo pela via gastrica. Os di-

versos animaes têm receptividade variavel para o germen: o carneiro é de todos o mais receptivel; em seguida vêm o boi e o cavallo, sendo este o mais resistente dos trez. O camundongo (*souris*), o cabayo e o coêlho contrahem facilmente o mal. O rato propriamente dito, o cão adulto, especialmente os cães de pello branco (porque?) resistem muito mais ás inoculações do carbunculo.

As aves, com especialidade os pombos e as gallinhas, offerecem uma extraordinaria resistencia. Entretanto essa resistencia póde ser vencida por certos artificios:—fazendo-se, por exemplo, a ablação do baço de um cão o animal adquirirá facilmente o carbuuculo; injectando-se pó impalpavel de carvão no sangue de um animal refractario este contrahirá a molestia, se lh'a inocularem; parece que os leucocytos abarrotando-se de carvão ficam sem acção para defender a economia.

Fazendo-se baixar a temperatura das gallinhas, que sabe-se ser de 43°, mergulhando-se-lhes as patas em agua muito fria, durante algum tempo, como fez Pasteur tantas vezes em suas conhecidas experiencias, aquellas aves adquirem o mal. O mesmo resultado elle conseguia administrando chloral ou morphina aos gallinaceos. As rãs, que são refractarias, deixam pelo contrario de o ser quando se eleva artificialmente a sua temperatura.

Emfim, convém ainda notar que a idade e o estado de saúde de um individuo póde fazer variar os effeitos da infecção, e que tal dóse de virus, inoffensiva para um animal de bôa saúde, matará seguramente o mesmo animal enfraquecido. A quantidade e a idade da cultura injectada têm igualmente uma grande importancia para o exito das experiencias.

ETIOLOGIA DO CARBUNCULO

SUMMARIO — Frequencia do carbunculo —Inquerito de Delafond em França.— Theoria da plethora.—*Campos malditos.*— Experiencias de Davaine : papel dos insectos ; a molestia no inverno.—Etiologia do carbunculo ; os espóros.—Experiencias de Pasteur. — Perigos do enterramento dos cadaveres carbunculosos. — Os vermes. — Prophylaxia do carbunculo : a molestia só dá uma vez.

Já sabemos que o carbunculo é uma molestia epidemica, inoculavel e causada por um micro-organismo — o *bacillus anthracis*. A sua etiologia deduz-se das propriedades d'aquelle germen, propriedades que já deixamos estudadas no capitulo precedente.

E' o carbunculo uma molestia muito espalhada na Europa e conhecida em quasi todos os pontos do globo : epidemias do mal têm sido notadas com frequencia na França, Italia, Hespanha, Allemanha, Siberia, Argentina, Brazil, etc. ; a molestia é tão frequente na zona intertropical, como nos paizes frios.

O paiz de Beauce é na França a terra classica do carbunculo ; é justamente lá que tambem a zoopathia tem sido

mais estudada, graças á iniciativa dos criadores e talvez mesmo por causa da proximidade de Pariz.

Era no verão que a molestia fazia maiores estragos; todos os annos n'aquella epoca desenvolvia-se terrivel epidemia, que matava milhares e milhares de carneiros e tambem animaes de outras especies, não deixando de atacar os grandes ruminantes.

Os pastores acreditavam que a molestia era devida a um excesso de sangue na economia, não só porque os animaes urinavam sangue, como tambem pelo enorme volume que o baço adquiria, devido á congestão intensa de que era séde aquella viscera. Esta ideia erronea dos pastores foi, sem mais exame, acceita por Delafond, que defendeu-a sob o nome de *theoria da plethora*, a qual foi geralmente combatida, e com vantagem, por quantos estudaram o assumpto racionalmente e baseados em elementos scientificos.

Logares havia em que a mortalidade era verdadeiramente espantosa; em outros a molestia tornou-se permanente, a ponto de serem as herdades n'elles situadas, abandonadas pelos proprietarios, que nenhum resultado tiravam mais da criação de carneiros n'aquellas pastagens, designadas por *campos malditos*, pela gente do logar. Entretanto bastava remover os rebanhos para um ponto contiguo e apenas separado dos *campos malditos* por uma simples cerca, para que a epizootia cessasse. A observação d'este facto e o conhecimento dos casos de contagio por inoculação no correr das experiencias anteriormente feitas, fizeram com que ninguem désse o menor valor á theoria dos pastores, defendida ingenuamente por Delafond.

Davaine teve a ideia de explicar o contagio pelas picadas dos insectos: elle apanhava algumas moscas e collocava-as sob uma campanula de vidro juntamente com um pouco de sangue carbunculoso; depois cortava a tromba e as patas d'esses insectos e inoculava-as em animaes, que muitas vezes adquiriam assim o carbunculo.

Ha n'essas experiencias um facto digno de nota: é

que no contagio natural do carbunculo bacteridiano, quasi nunca se encontra edema no corpo dos animaes; em quanto que estas picadas apresentavam constantemente um edema bem desenvolvido. Davaine explicava o facto allegando que as moscas quando estavam armadas de seus esporões picavam mais profundamente, penetrando sob o derma; era n'estas condições que apparecia o tumor edematoso, que, pelo contrario, não se desenvolvia, quando as moscas estavam desarmadas.

Querendo saber si o virus carbunculoso resistia ou vivia muito tempo, elle fez experiencias n'esse sentido e chegou á conclusão de que no sangue putrefacto os germens morriam; ao passo que seccando-se immediatamente o sangue retirado de um animal, a bacteria conservava a sua vitalidade e reproduzia a molestia, uma vez inoculada.

D'estes factos tirou Davaine as seguintes illações para a sustentação do seu modo de ver sobre a transmissão do mal pelas moscas: dizia elle que as moscas pousando nas peças de carne, nas pelles espichadas, no sangue emfim, este adheria ás patas do insecto, onde seccava rapidamente. O insecto conservava a semente e a transmittia aos animaes, picando-os ou simplesmente pousando sobre qualquer escoriação, que por ventura o animal tivesse em sua pelle.

Não ha difficuldade em acceitar-se esta explicação que é muito natural; e nem Davaine, com justiça, póde ser accusado de erro de experimentação; sómente ignorava-se, ao tempo em que elle fez seus estudos, a existencia dos *espóros*, que só muito depois foram descobertos; assim como elle desconhecia o facto, hoje corrente, de que si as formas vegetativas do germen pódem viver oito ou dez semanas sobre o sangue secco, ellas perdem todavia a virulencia depois d'esse periodo de tempo. Só os espóros vão muito além; graças a elles o carbunculo perpetuava-se n'aquellas regiões, contaminando os rebanhos, com ou sem a intervenção das moscas, isto não vem ao caso.

Objectou-se-lhe a pouca frequencia do carbunculo no

inverno. Davaine replicou logica e triumphalmente que n'aquella estação as moscas eram rarissimas, ou não existiam de todo, visto o frio matal-as ; o que na verdade é um facto fóra de contestação.

Perguntou-se-lhe ainda porque em certas montanhas do Auvergne os carneiros contrahiam a molestia, ao passo que em outras montanhas muito visinhas das primeiras os rebanhos conservavam-se indemnes?

—Era porque as moscas, uma vez adstrictas a um certo rebanho, acompanhavam-n'o para toda parte sem deixal-o mais.—Argumento um tanto fraco, mas ainda acceitavel.

Mostrou-se-lhe o facto de dous rebanhos separados apenas por uma barreira de arame farpado : um contaminado de carbunculo, e o outro inteiramente livre da molestia. Davaine, que achou sempre explicações verosimilhantes, d'esta vez vio-se embaraçado para sustentar a sua opinião de que as moscas representavam um papel decisivo na transmissão do carbunculo ; opinião que foi aliás partilhada por muitos medicos d'aquella época, sem outro exame que não a palavra uns dos outros, que receberam a ideia de Davaine.

Abriu-se então um inquerito scientifico, nomeando-se para isso uma commissão, cujos membros tinham infelizmente opiniões preconcebidas sobre a questão e confundiam carbunculo bacteridiano com carbunculo symptomatico ; o resultado foi nunca se entenderem e portanto nada poderam concluir.

Foi a Pasteur que coube a honra de demonstrar em 1876 á evidencia o papel do espóro, que Davaine não chegou a conhecer para tudo explicar ; elle que foi o unico até então a fazer estudos conscienciosos e a tirar conclusões racionaes de suas observações e experiencias, adiantando sem duvida, alguma cousa de scientifico no estudo do carbunculo, no tempo em que o assumpto andava tão embrulhado e a bacteriologia não tinha adquirido ainda o direito de cidade.

Pasteur projectou uma luz intensa sobre o debate : elle

transportou-se ao paiz de Beauce e começou os seus estudos no proprio centro onde se elaboravam as epidemias celebres e mortiferas de carbunculo. Alli fez elle com que os carneiros comessem espóros e conseguio ver o carbunculo desenvolver-se n'aquelles animaes, em cujos excrementos eram encontrados tambem os espóros. Acompanhando a molestia, elle notou que a temperatura subia logo depois da ingestão e que a morte vinha logo pôr termo aos soffrimentos do animal, cuja autopsia revelava todos os signaes do carbunculo adquirido por contagio natural.

Se os espóros eram administrados aos carneiros juntamente com corpos duros, cheios de arestas e capazes de comprometter a integridade da mucosa gastro-intestinal, o numero de animaes contagiados augmentava.

Facilima a explicação do phenomeno : as escoriações feitas pelos corpos duros ao longo do tubo intestinal eram outras tantas portas de entrada abertas ao microbio, que sem isso passava muitas vezes intacto sob a forma de espóro e era rejeitado com os excrementos, ou era atacado em sua fórma vegetativa pelo succo gastrico.

Pasteur reconheceu ainda que nem todas as especies animaes adquiriam o mal pela via gastrica : assim succede com o coêlho e o cobayo que não são contaminados por aquelle meio ; emquanto que o boi, o carneiro, o cavallo e o camundongo (*souris*) contrahem a molestia ingerindo o germen. Partindo do conhecimento d'este facto o experimentador genial pensou, e com razão, que si os animaes adquiriam a molestia pela via gastrica era porque o carbunculo devia existir sob a fórma de espóros na superficie do solo, onde aquelles animaes pastavam.

Convencido de que o facto era verdadeiro, Pasteur dirigio-se a alguns dos famosos *campos malditos*, tão communs no paiz de Beauce, e recolheo um pouco de terra, que diluio em agua commum, deixando por fim a mistura repousar durante algum tempo. Depois aqueceo a terra até

uma temperatura que mata a maior parte dos microbios, mas é sem acção sobre os espóros do carbunculo.

Aquella terra inoculada em alguns animaes deu-lhes a molestia, da qual morreram quasi todos ; difficilmente, porem, o experimentador conseguio culturas puras d'esses germens. Entretanto ficara estabelecido e fóra de contestação «que o germen do carbunculo existia na terra, e que era pastando n'aquelles logares, que os carneiros recebiam o contagio.»

Como explicar-se a existencia de tão grande quantidade de espóros carbunculosos em certos e determinados campos?—Os animaes mortos da molestia eram esfolados e divididos sobre aquelle sólo, onde cahiam tambem o sangue e as urinas sanguinolentas, verdadeiros meios de cultura, proprios para a proliferação de germens. Sob a influencia do ar formavam-se os espóros, cuja grande resistencia é bem conhecida hoje : e assim perpetuava-se a molestia n'aquellas pastagens.

Ainda mais : os pastores alimentavam os cães, que costumam acompanhar os rebanhos, com a carne carbunculosa ; muitas vezes aquelles animaes, ainda com a bôca ensanguentada, mordiam as ovelhas :—nova origem da molestia, que d'esta vez tinha sido verdadeiramente inoculada.

E por fim eram os restos dos animaes superficialmente enterrados alli mesmo no campo : durante a noute certos animaes carniceiros vinham revolver as covas ;—outra fonte de contagio. As bacteridias assim espalhadas e em contacto com o ar davam espóros, de sorte que no fim de algum tempo certas pastagens apresentavam uma quantidade assombrosa de germens carbunculosos ; e estavam assim constituidos os taes *campos malditos*, onde nenhum rebanho era poupado.

Entretanto si os espóros ficassem sempre na superficie do solo expostos á influencia da luz e do ar, no fim de algum tempo elles seriam infallivelmente destruidos ; assim porem não succedia porque todos os annos as terras eram revolvi-

das e os germens passavam para as camadas inferiores, onde ficavam ao abrigo dos elementos destruidores. Si a terra continuava secca nada de anormal observava-se; logo, porem, que chuvia não tardavam a apparecer as epidemias.

Pasteur explicava assim o phenomeno :—Os vermes do solo (minhocas) procurando seus alimentos, introduziam nos intestinos aquella terra contaminada ; mais tarde, remontando á superficie do solo esses mesmos vermes deixavam ahi, com os seus escrementos, os espóros que tinham trazido das camadas inferiores. Koch combateo esta explicação, mas Pasteur replicou-lhe por uma serie de novas e rigorosas experiencias, que deixaram o facto bem estabelecido.

Das pesquizas de Pasteur e dos factos por ellas revelados, deduzia-se facilmente a prophylaxia :—era preciso não enterrar mais os cadaveres de animaes carbunculosos, que entrando em putrefacção forneciam o oxygenio e o calôr necessarios á formação dos espóros.

Com este intuito crearam-se cemiterios especiaes, cercados de muros, para o enterramento dos corpos contaminados ; mais tarde, ainda fez-se cousa melhor :—passou-se a dissolver os cadaveres dos carneiros em *acido sulfurico*, que é baratissimo em França ; essa dissolução era reunida depois aos phosphatos, constituindo então um excellente adubo, isento de espóros e muito procurado pela lavoura.

O homem era muitas vezes contaminado directamente, adquirindo com frequencia a pustula maligna, cuja gravidade é de todos conhecida. Entretanto não é esta a unica forma humana do carbunculo ; é assim que os operarios que manipulam a lã nos centros manufactureiros, ou em outra qualquer circumstancia, como em Bradford, na Inglaterra (*woolsorter's disease*) e em Vienna os trapeiros, são muitas vezes contaminados pelas vias respiratorias (*carbunculo pulmonar*) apresentando uma pneumonia especial, com edema do mediastino, em geral difficil de diagnosticar-se, a não ser *post mortem*. O carbunculo pode ainda,

se bem que mais raramente, penetrar no organismo humano pelas vias digestivas, trazendo grande prostação, febre e mais signaes característicos da molestia, inclusive bacterias no sangue.

Hoje a *pustula maligna* quasi que desappareceo completamente da França, com especialidade de Pariz, em cujos hospitaes notavam-se outr'ora numerosos casos sahidos da classe dos magarefes e talhadores dos açougues. As precauções tomadas explicam o facto da raridade hoje observada.

O carbunculo só dá uma vez; este facto ja era conhecido no começo dos estudos, porque notou-se que os raros animaes que escapavam á molestia contrahida naturalmente, inoculados mais tarde, nunca tiveram o carbunculo.

VACCINAÇÃO CONTRA O CARBUNCULO

SUMMARIO — O espóro conserva a virulencia da bacteridia que o gerou. — Resistencia dos espóros aos diversos agentes. — Attenuação da bacteridia. — Escalas de virulencia. — Vaccina : sua escolha e conservação. — Acção dos antisepticos sobre as culturas. — Aquecimento do sangue.— Experiencias.— Volta á primitiva virulencia ; exaltaçao d'esta por meio de passagens successivas. — Toxina elaborada pelo *bacillus anthracis*.—Vaccinação pela toxina.—Propriedade do serum dos animaes immunisados contra o carbunculo. — Modo de vaccinar.

Adquirido o facto de que um primeiro ataque da molestia conferia a immunidade, Pasteur procurou em seu laboratorio descobrir um virus attenuado que produzisse uma molestia ligeira, capaz entretanto de preservar os animaes do carbunculo, do mesmo modo que na especie humana a vaccina confere a immunidade contra a variola.

Logo em começo elle conseguio attenuar a bacteria ; mas o espóro que é a forma de resistencia do microbio, continuava a ter a mesma virulencia, e Pasteur demonstrou que este espóro conserva tambem a mesma virulencia da

bacteria que o gerou. Então elle procurou modificar as formas vegetativas do germen : a 14 gráos obtinha-se uma forma hypertrophiada, monstruosa, que não dá espóros ; acima de 41 gráos appareciam filamentos abundantes, porém nada de espóros. A' temperatura de 42 gráos e meio appareciam os *falsos espóros* de Chauveau, que nada têm de commum com os verdadeiros : são, como já vimos no capitulo precedente, uns pontos brilhantes que observa-se no interior dos bastonetes, quando desenvolvidos em uma cultura de caldo alcalinisado, feita em um balão (porque em tubos a evaporação é rapida e não permitte aquelle resultado), a semente sendo proveniente do sangue fresco de um animal carbunculoso. Não se podia levar além 42,°5 a aquecimento da cultura, porque a 44° já o desenvolvimento do germen era quasi nullo, e a 45° parava definitivamente.

A bacteridia crescia lentamente sob a forma de filamentos curvos espalhados pelo liquido, de onde desappareciam os flócos caracteristicos das culturas ordinarias. Todos os factos observados n'aquellas experiencias de Pasteur são rigorosamente exactos e têm sido posteriormente verificados por todos os bacteriologistas.

Um carneiro inoculado n'aquellas condições morria no fim de tres dias. A mesma cultura um pouco mais velha actuava mais vagarosamente, podendo até poupar o animal si a deixavam ficar ainda mais velha. Uma cultura de 10 ou 12 dias, inoculada em um carneiro, communica-lhe a molestia sob uma fórma benigna, que não o matará. Levando-se mais longe a experiencia chega-se a não matar mais nem o coêlho, o cobayo ou o camundongo, que são na ordem em que estão indicados os mais sensiveis ao carbunculo, d'entre os pequenos animaes usados nos laboratorios.

Nem sempre, porém, as cousas passam-se com esta nitidez : todas as cellulas do liquido não têm a mesma actividade na mesma occasião e no mesmo individuo, por

motivos que são de observação vulgar em experiencias de biologia.

Si tomarmos culturas de 4, 8 e 12 dias e semearmos tres balões correspondendo respectivamente cada um delles a outras tantas culturas d'aquellas idades e os aquecermos, não a 42°,5, mas a 33°, observaremos, inoculando as novas culturas, que cada uma d'ellas terá, em qualquer dia ou em qualquer epoca que seja, a mesma virulencia da cultura mãi, na occasião em que foi tomada.

E' que todas as vezes que semeamos uma cultura filha nós creamos uma raça nova de bacterias attenuadas; esta attenuação transmitte-se por hereditariedade e é além d'isso fixada mais tarde, de modo que a virulencia perdida não é mais recuperada pela bacteria.

As culturas filhas do balão de 8, 16 e 20 dias podem dar espóros; ao passo que a cultura mãi não os dará, por causa da alta temperatura a que está submettido o balão original. Aquelles espóros teem a mesma virulencia que os filamentos de onde provieram e fixam definitivamente a sua força de resistencia, assegurando a reproducção da nova raça, com o mesmo gráo de toxidade.

E' sobre estes principios que assentam a theoria e a pratica da vaccinação anti-carbunculosa. Se inocularmos uma cultura de 10 dias em um coêlho, em um cobayo e em um carneiro, aquelles dous roedores morrerão, ao passo que o carneiro resistirá. Se de novo inocularmos mais tarde e com virus mais forte este ultimo animal e outro carneiro, que ainda não tenha sido injectado e que possa servir de termo de comparação ou de *testemunha*, como se diz em linguagem de laboratorio, o carneiro testemunha morrerá, emquanto que o primeiro nem ao menos ficará indisposto. Para preservar um animal do carbunculo, basta pois, injectar-lhe sob a pelle um pouco de cultura attenuada de modo a só transmittir-lhe uma ligeira forma da molestia.

Em summa: se fizermos uma cultura mãe do bacillo

carbunculoso e se todos os quatro dias fizermos novas culturas sahidas dessa cultura numero —1—teremos uma serie de tubos com uma virulencia definida em escala decrescente. Se ainda, com cada uma d'estas culturas filhas, sempre mais velhas quatro dias do que a sua visinha, nós inocularmos um carneiro, este contrahirá uma molestia passageira, tanto menos grave quanto mais velha fôr a cultura. e ficará preservado contra o carbunculo. Entretanto é preciso contar sempre com as idyosincrasias e com os diversos gráos de receptividade individual, porque uma cultura inoffensiva para o carneiro —A—poderá matar o carneiro—B ; — d'ahi nasceu a ideia de preparar duas vaccinas : uma muito fraca que è injectada em primeiro logar ; e uma outra forte que se repete alguns dias mais tarde. Esta pratica é hoje corrente em toda a França.

A primeira vaccina deve ser tal que a sua virulencia não mate um coêlho ou um cobayo ; devendo, porém, em dóse mediana matar infallivelmente um rato. A segunda, que não deve matar um carneiro, deverá fazel-o a um coêlho, ou cobayo. Após as duas vaccinações feitas com intervallo de poucos dias, o animal está immunisado. Isso foi demonstrado pela primeira vez, do modo mais brilhante por Pasteur na celebre experiencia publica que no anno de 1876 elle fez na herdade de *Pouilly le Fort*, perto de Melun, onde trata-se de elevar um monumento que perpetue aquella admiravel experiencia, de tão grande alcance economico para a França.

Foi referindo-se mais especialmente á vaccina anticarbunculosa que o sabio professor Huxley, de Inglaterra, emittio a seguinte proposição, que aliás não se applicava senão a uma pequena parte da obra do genial francez ; «As descobertas de Pasteur bastariam para cobrir a indemnisação de guerra, no valor de *cinco bilhões*, pagos pela França a Allemanha».

N'aquella memoravel demonstração de Pouilly-le-Fort

Pasteur experimentou sobre 60 carneiros e 20 vaccas, e em todos esses animaes as cousas passaram-se conforme tinham sido previamente annunciados por elle. Desde aquelle dia a vaccinação contra o carbunculo entrou na pratica ; affluiram de todos os lados pedidos de vaccina ; dos 50,000 carneiros apresentados Pasteur só vaccinou 25,000 ; e como reinava o carbunculo, alguns carneiros já traziam o germen do mal no organismo, pelo que deram-se algumas mortes entre os vaccinados ; mas estes poucos casos nada eram, comparados com a excessiva mortalidade dos não vaccinados, vivendo aliás as duas series em commum e nas mesmas condições.

Os poucas casos de morte entre os vaccinados serviram de ensinamento a Pasteur, que recommendou que d'alli por diante se fizesse a vaccinação antes da epoca em que costumavam explodir as epizootias de carbunculo : os resultados foram excellentes, conforme estamos vendo hoje. Acabaram-se tambem os *campos malditos* que readquiram o seu valor normal, permittindo excellentes negocios a especuladores mais atilados, que alcançando o futuro do methodo pastoriano, apressaram-se em adquirir aquellas pastagens desvalorisadas, aos seus imprevidentes possuidores pelo baixo preço de então, para revenderem-n'as pouco depois com grandes lucros. Com o carbunculo foi-se tambem a pustula maligna, que, como já dissemos, é hoje rarissima em França.

— A immunidade seria duradoura ?— Quanto tempo levariam os carneiros preservados contra o carbunculo?

Experiencias feitas em Montpellier provaram que, salvo raros casos individuaes, a immunidade ia pelo menos além de tres annos, o que era bastante para as necessidades da agricultura, uma vez que esta é a duração media de um carneiro destinado á alimentação. Aliás nada se oppõe a uma revaccinação, como fazem alguns criadores.

A Europa inteira : a Italia, Hespanha, Russia, Austro-Hungria, Paizes dos Balkans, etc., adoptaram a vaccina

pastoriana, com o mesmo exito que notara-se na França. Na Allemanha, porém, só mais tarde o processo pôdese vulgarisar, porque no começo Koch fez-lhe viva opposição instituindo experiencias que contradiziam as de Pasteur. As experiencias do bacteriologista allemão eram realmente feitas em condições excepcionaes e não se approximavam nem de longe da maneira pela qual os carneiros adquiriam o mal: Koch abarrotava os animaes de culturas contendo quantidades formidaveis de espóros. Ora, tudo tem limite, e o organismo que resiste a ingestão de uma certa quantidade de virus (como é o caso dos carneiros, que procurando seu alimento nos prados ingerem, com as gramineas, um certo numero de germens) este organismo (bem comprehende-se), não resistirá certamente a dóses massiças do mesmo virus. Afinal a evidencia do methodo acabou conquistando tambem o illustre contradictor de Pasteur, que já reconheceo a sua utilidade; mesmo porque não era mais licito hesitar diante dos milhões de carneiros immunisados e dos milhões de francos poupados na patria de Pasteur e fóra d'ella.

Posteriormente ensaiou-se e conseguio-se outro processo de attenuação do virus: tratando-se, por exemplo, as bacterias sem espóros pelo acido phenico, pelo bichromato de potassa a 3 ou 4 millesimos, ou pelo oxygenio sob a pressão de 8 atmospheras, consegue-se um virus attenuado capaz de dar a immunidade. Todos estes processos têm algum valor, porque é de facto ao oxygenio que se deve a attenuação do virus; tanto isto é certo que se fizermos uma cultura sem ar, ou com muito pouco, e a collocarmos a uma temperatura de 42°,5 ella não perderá a sua virulencia inicial.

No sangue recolhido do coração de um animal morto de carbunculo julgou Toussaint não existir uma só bacteria desde que o sangue era aquecido a 55°; o facto, porém, é que ellas só morrem todas a 58°; as bacterias que restavam da experiencia de Toussaint ficavam attenuadas, mas

readquiriam a sua virulencia injectadas sob a pelle de um animal, que acabava morrendo de carbunculo.

O sangue aquecido a 58,° (o que quer dizer que todas as formas vegetativas do microbio morreram) e injectado na dose de 15 a 25 centimetros cubicos, é capaz de immunisar um animal, após curta molestia. Infelizmente esta immunidade communicada pelas substancias chimicas do sangue, é muito fragil e pouco duradoura.

Nas vaccinações de laboratorio deve-ve agir com prudencia para não matar os animaes, tão uteis ás pesquizas. No coelho emprega-se uma primeira vaccina muito fraca, da qual injecta-se de 15 a 20 centimetros cubicos nas veias do animal ; oito dias depois far-se-á então uma injecção subcutanea de uma cultura mais forte.

Pode-se levar a attenuação a um gráo tal que a bacteria se torne verdadeiramente saprophyta ; e se não se souber a sua origem é impossivel reconhecer o microbio. A virulencia é, pois, uma qualidade que se perde.

Entretanto tambem podemos exaltar essa virulencia. Com um pouco de uma cultura inoffensiva para um rato adulto nós podemos matar um rato recem-nascido ; com o sangue d'este ultimo mata-se um rato de quatro dias ; com o sangue d'este segundo rato mata-se um outro de 8 dias e assim successivamente.

A cultura que chega a matar um rato adulto, inoffensiva para o cobayo, matará um recem-nascido d'esta especie. Se continuarmos subindo a escala, de especie em especie, chegaremos a crear uma raça de bacteridias, cuja virulencia extremamente exaltada chegará a matar as especies mais refractarias.

Este facto, nota o professor Roux, leva-nos a crer que os microbios pathogenicos hoje conhecidos vieram talvez de especies saprophytas, que circumstancias fortuitas e favoraveis conduziram á virulencia, transformando-os, na successão ininterrupta dos seculos, em raças novas que actualmente causam tanto damno ao homem e aos animaes.

Da experiencia de Toussaint resultou o ensinamento de que a bacteria desenvolvendo-se, dá productos chimicos que conferem uma certa immunidade.

O microbio modifica o meio de cultura reagindo sobre elle e secretando *toxinas* ou productos chimicos. Para obter-se a toxina do carbunculo é necessario cultivar o microbio em uma solução de peptona, abaixo de 30 gráos; alguns dias depois filtra-se na vela Chamberland, satura-se o liquido de sulfato de ammoniaco e obtem-se por este meio uma «albumose». Este precipitado recolhido em um filtro é lavado com sulfato de ammoniaco, depois é dialysado em uma corrente de agua a 42°, até que o sulfato de ammoniaco tenha desapparecido completamente. Mistura-se então o liquido contido no dialysador com 10 vezes o seu volume de alcool forte para precipitar a albumose; esta ainda é tratada pelo alcool absoluto e pelo ether, e como manipulação final obtem-se um pó, que é a toxina do carbunculo. Esta substancia injectada em um cobayo mata-o; mas administrada em pequenas quantidades confere a immunidade.

Nas vaccinações do carneiro pode-se, por meio de gradações successivas, injectar bacterias muito virulentas; o serum do animal adquire propriedades novas preservadoras do mal. Marchoux conseguio injectar impunemente em um carneiro até 25 c. cubicos de uma cultura muito virulenta. Sob a influencia d'esta vaccinação intensiva o animal adoeceo, mas curou-se, e o seu serum, na dose de um c. cubico, preservou um coelho. Ainda o mesmo serum injectado em um animal que já tenha o germen do carbunculo, salval-o-á se a intervenção se der nas primeiras horas.

Infelizmente esta immunidade devida ao serum não dura muito; parece que ella dà aos phagocytas força para digerir apenas as formas vegetativas, porque em presença dos espóros já ella não actúa mais. Por isso tambem o virus attenuado confere uma immunidade muito superior á

acção ephemera dos phagocytas; isto sob todos os pontos de vista.

A vaccina anti-carbunculosa usada na França é preparada pelo «Instituto Pasteur». La é ella distribuida aos veterinarios em tubos contendo 100 dóses, custando cada dose *cinco centimos* ou um *sou*. Inocula-se a primeira vaccina (mais fraca) na dose de 1/8 de c. cubico, de preferencia na face interna da coxa direita do carneiro; e 12 dias mais tarde faz-se na côxa esquerda do animal, no mesmo logar e com a mesma dose, outra injecção da segunda vaccina mais virulenta. Excusado é dizer que as vaccinas devem ser utilisadas immediatamente depois da abertura do tubo, e a seringa deve ser esterilisada, havendo sobretudo a mais escrupulosa antisepsia.

CHOLERA DAS GALLINHAS

SUMMARIO — Caractéres da molestia : symptomas, lesões.—Microbio : coloração e cultura.—Reacção local ; injecções—Attenuação das culturas. — Vaccinação : lesões locaes.—Conservação do virus no solo.—O virus nos laboratorios.—Especies sensiveis : aves, coêlhos, «spermophilo»—Os grandes animaes resistem.—Liquidos de cultura privados de microbios.—Serum dos animaes vaccinados.

O cholera das gallinhas é uma molestia que ataca a maior parte das aves domesticas, e muito especialmente as gallinhas. Um dos principaes symptomas da molestia é a diarrhéa ; d'ahi veio-lhe a denominação de *cholera*, pela similhança que apresenta a molestia com o cholera aziatico.

O cholera das gallinhas reina ás vezes esporadicamente ; mas de ordinario é uma doença epidemica, que faz grandes estragos nos gallinheiros e é dotada de grande poder de expansão. A sua intensidade é tal que em um gallinheiro de 3,000 cabeças, no fim de quatro dias, chegou-se a observar uma mortalidade de *noventa* por cento ! Depois de uma irradiação brusca, a molestia segue ordinariamente a marcha chronica.

Sabia-se que o mal era contagioso e que era reproduzido por inoculação. Em 1860 Delafond fez diversas inoculações com o sangue e conseguio reproduzir a molestia com todos os caractéres que ella apresenta quando adquirida naturalmente : « o cholera das gallinhas » é por conseguinte uma molestia microbiana, inoculavel, contagiosa e epidemica.

Clinicamente ella affecta varias formas. Na forma fulminante o animal isola-se, deixa pender as azas, agacha-se, a plumagem arripia-se, a crista toma a côr violacea e no fim de algumas horas a ave cessa de viver.

Na forma ordinaria a gallinha fica triste, deixa de comer, ás vezes bebe, mas encolhe-se, tem os olhos fechados e fica somnolenta a maior parte do tempo. Sobrevem logo uma diarrhéa aquosa abundante, de aspecto espumoso, às vezes com traços sanguinolentos ; a morte dá-se no fim de 36 a 48 horas. A forma chronica succede quasi sempre a um ataque agudo de que a ave parece curada e traduz-se por uma especie de cachexia que mata entre 8 e 10 dias.

A autopsia revela o seguinte : do bico escorre uma espuma sanguinolenta ; o anus é saliente ; a pelle é coberta de ecchymoses ; os vasos abdominaes estão replectos de um sangue negro e formam arborisações.

O baço é normal, mas os intestinos são congestionados ; o pericardio contem um liquido amarello-citrino que coagula-se em contacto com o ar ; os pulmões apresentam-se hyperemiados e algumas vezes mesmo hepatisados. Todos os humores contêm microbios visiveis independente de qualquer coloração.

Em 1880 Toussaint fez desses germens uma excellente descripção ; depois Pasteur descobrio o meio de attenuar a sua virulencia. Foi no correr desses estudos que elle fez a maior parte de suas descobertas em microbia.

O germen productor do cholera das gallinhas tem a forma ovoide e encontra-se de preferencia entre os globulos sanguineos. Quando coloridos é nos dous polos que a

tinta é mais visivel. Nos casos em que a molestia tem sido mais longa os microbios são mais alongados e tomam quasi a forma bacillar, conservando, porém, as extremidades arredondadas. Nas culturas o germen apresenta a mesma tendencia a alongar-se, á proporção que ellas envelhecem.

O microbio não toma o *gram*, mas acceita bem as côres da anilina. O seu methodo de eleição é, porém, o da *thionina phenicada*, cujo colorido accentua-se mais, conforme já vimos, para as extremidades do *cocco-bacillo*, como já tem sido tambem denominado esse germen, por causa de sua forma ovoide alongada.

O microbio do cholera das gallinhas cultiva-se em caldo ordinario. A principio o meio turva-se uniformemente sem apresentar caracteres particulares; mais tarde, porém, os germens depositam-se no fundo do vaso deixando o liquido perfeitamente limpido. Em gelose o microbio deixa um rastilho esbranquiçado; mas desenvolve-se mal quando aquelle meio é puro. No serum solidificado cultivam-se regularmente os germens que são aerobios, exigindo oxygenio livre e uma temperatura de 30 a 37 gráos.

Conforme já vimos, inoculados elles reproduzem a molestia, facto que tambem se dá quando são introduzidos pelas vias digestivas.

Quando inoculados pela via subcutanea notam-se lesões variadas no ponto de penetração: abcessos, escaras, etc., mas sem gravidade quando a molestia evolue rapidamente; muito serias, pelo contrario, quando a molestia marcha lentamente.

O microbio não dá esporos: elle conserva a forma vegetativa e por isso mesmo é muito sensivel aos agentes exteriores. O calôr a 58° durante alguns minutos, os antisepticos em geral e a deseccação matam aquelle germen rapidamente. Mas tambem collocado em boas condições, sua virulencia não desapparece logo, como acontece com o carbunculo.

Fazendo-se uma primeira cultura do germen poder-se-á

ter todos os quatro ou oito dias uma cultura-filha que fixará a sua virulencia, segundo a data em que tiver sido semeada. Esta attenuação é hereditaria e permitte praticar a vaccinação nas mesmas condições que a do carbunculo ; isto é : inoculando-se primeiramente um virus fraco, e outro mais forte, doze dias mais tarde.

A virulencia da segunda vaccina deve ser tal que *mate cinco, sobre dez* gallinhas ainda não inoculadas anteriormente. A segunda inoculação confere a immunidade contra a molestia. Na pratica a inoculação faz-se na ponta da aza, por causa da reacção local que se pode produzir, tanto mais grave, quanto a molestia geral fôr mais benigna.

Quando um gallinheiro é invadido pelo *cholera* é muito difficil desinfectal-o. Os antisepticos são muitas vezes de um valor illusorio, porque os microbios penetram no solo, onde conservam-se muito bem durante dous ou tres annos.

Os passaros em geral morrem injectados com uma dóse do virus que não mataria uma gallinha, ou mesmo um pombo.

O coêlho é animal muito sensivel ao «cholera das gallinhas» e adquire a molestia por ingestão ; é mesmo uma propriedade commum a todos os roedores a de contrahir aquella molestia pela via digestiva.

Esta circumstancia foi aproveitada na pratica para a extincção de coêlhos, que em certos paizes, como na Australia, se reproduzem em numero tão consideravel que constituem uma verdadeira praga muito prejudicial á lavoura. Então communicam-lhes o germen da molestia, e em pouco tempo uma extensa epizootia desenvolve-se, alliviando os campos dos estragos d'aquelles roedores. Igual procedimento tem-se na Russia com o *spermophilo*, outro pequeno animal damninho que causa grande mal á lavoura d'aquelle vasto paiz.

O cobayo, porém, resiste fortemente ao bacillo : quando muito, consegue-se um pequeno abcesso no ponto inoculado,

em cujo puz encontra-se o germen que vai infectar o solo, onde outros animaes podem contrahir a molestia.

Os grandes animaes são refractarios ao microbio do cholera das gallinhas.

O serum dos animaes hyper-vaccinados confere a immunidade contra a molestia.

ROUGET E PNEUMO-ENTERITE

SUMMARIO — «Rouget» agudo e chronico: symptomas e lesões.—Gráo de lethalidade.—Bacillo do «rouget» no sangue e em outros orgãos.—Methodos de coloraçao.—Cultura sobre os diversos meios.—Conservação dos microbios. — Animaes receptiveis. — Contagio.—Attenuação do bacillo.—Serum dos animaes immunisados.—Septicemia dos ratos.—Similhança do bacillo d'esta molestia com o do «rouget».—PNEUMO-ENTERITE dos porcos — «Hog-Cholera» e suas diversas denominações.— Distincção entre esta molestia e o «rouget». — Cocco-bacillo da pneumo-enterite: seus caracteres.— Toxina do «hog-cholera».—Propriedades do serum dos animaes immunisados.

Em certas circumscripções da Bretanha reinava annualmente uma epizootia atacando os porcos. Os prejuizos provenientes d'essa molestia attingiam á enorme cifra de *quatrocentos milhões de francos* em cada anno! Esta molestia é o *rouget*, que apresenta ora a forma aguda, ora a chronica, havendo muitos casos em que o mal reveste a forma super-aguda. N'este ultimo caso o porco deixa de comer, tem calefrios e deita-se na palha, procurando

abrigar-se ; em seguida apparece a febre, a respiração torna-se offegante : apparecem manchas vermelhas ao redor das orelhas ou na face interna dos membros posteriores ; mas nem sempre ha tempo para se manifestarem as manchas ; o povo chama então *sangue branco* a essa forma da molestia, que termina sempre pela morte.

A forma aguda dura de dous a tres dias e manifesta-se com os mesmos symptomas já descriptos, porém menos accusados. As manchas vermelhas apparecem em grande abundancia ; em seguida vem uma diarrhéa que conduz muitas vezes á morte. A forma chronica succede ordinariamente a um ataque agudo do mal : as manchas vão ficando mais desmaiadas e o animal emmagrece consideravelmente. E' nesta forma que observam-se ás vezes lesões articulares, que levaram a pensar-se que o animal tinha a gôtta. Os porcos de menos de quatro mezes são raramente accommettidos do mal ; nos outros mais idosos a molestia é acompanhada de uma verdadeira endocardite.

Pasteur e Thuillier estudaram o *rouget* no departamento de Vaucluse ; no correr das experiencias elles verificaram que o sangue e a polpa dos orgãos transmittiam a molestia, e que esta ainda era mais contagiosa quando dada pelas vias digestivas, Estudando o sangue ao microscopio elles descobriram entre os globulos sanguineos uns pequenos bacillos, não em grande numero ; estes germens tomam o *gram*, que é mesmo o seu methodo de eleição ; entretanto a thionina é tambem propria para coloril-os.

Em caldo peptonisado e alcalino o *rouget* cultiva-se facilmente, mas a cultura é muito discreta : o liquido mostra-se apenas ligeiramente turvo e quando é agitado deixa perceber umas ondulações sedosas.

Em gelatina o bacillo dá estrias excessivamente finas, com prolongamentos muito tenues, sómente visiveis á uma grande claridade, apresentando um aspecto simillhante ao de pêllos mergulhados no liquido. Em gelose e sobre batatas as culturas são ainda menos visiveis. O microbio

vive indifferentemente no ar ou fóra d'elle, preferindo, porém, o estado aerobio. Não dá espóros e morre a 58° de temperatura, assim como em presença dos antisepticos, em diluições muito fracas.

Inoculando-se a cultura em um porco, o animal não morre; entretanto a injecção intra-venosa communica o mal sob uma forma mais grave, como dá-se com a ingestão. A inoculação, porém, é fatal para outras especies: nos logares onde reina a molestia observa-se a contaminação natural dos coêlhos, dos ratos e dos pombos.

Como já vimos, o microbio do rouget não da espóros; se elle persiste nos chiqueiros é por um processo analogo ao do germen do cholera das gallinhas.

Para conservarmos o germen do mal do porco é necessario fazel-o ao abrigo do ar, em ampollas de vidro, fechadas á lampada. Sempre que se quizer utilisar o germen é preciso rejuvenescel-o por meio de uma cultura; n'estas condições elle readquire a mesma virulencia que tem no sangue; pelo que é preferivel conservar o sangue.

Nos chiqueiros faz-se o contagio pela ingestão de alimentos contaminados pelas dejecções dos animaes doentes. E' mais ou menos do mesmo modo que dá-se a contaminação nos mercados ou feiras de porcos. As epizootias do rouget podem tomar um gráo de lethalidade extraordinario, como succedeo em 1893 na Hungria, onde chegou-se a registrar 22.000 mortos em 28.000 porcos atacados!

Prepara-se uma *vaccina* contra o rouget pela attenuação de um virus, que se consegue collocando uma cultura muito activa na estufa, onde os microbios vão perdendo a sua virulencia progressivamente, a ponto de não matarem mais os coêlhos ou os pombos, porém ainda matarem os ratos. N'este gráo elles conferem ao porco uma immunidade duradoura.

Ha tambem outro processo de attenuação, que consiste em fazer se passar o microbio pelo organismo do coêlho;

mas então é preciso fazer-se uma cultura do germen em caldo, entre cada uma das passagens de coêlho a coêlho. No fim de algumas passagens nota-se que quanto mais virulento é para o coêlho (porque n'este animal a virulencia exalta-se) menos perigoso é elle para o porco.

—A attenuação proveniente do habito que um microbio adquire vivendo em uma especie nova explica talvez a vaccina jenneriana, observa o professor Roux.

A vaccinação contra o rouget faz-se segundo o processo posto em pratica contra o carbunculo e o cholera das gallinhas: dous virus de intensidades differentes, guardando-se um intervallo de 12 dias entre as duas injecções. As raças grosseiras de porcos, os javalis, as velhas raças francezas, são mais resistentes do que as raças finas inglezas, que apresentam grande receptibilidade para o mal. A idade mais conveniente para a vaccinação é a de quatro mezes; uma unica vaccinação, (com os seus dous tempos, já se vê), chega de sobra para preservar os porcos durante sua curta existencia, destinados, como são esses animaes, a morrer novos. Os varrões, porém, devem ser vaccinados de dous em dous annos.

Os bons resultados colhidos em França com esta vaccina são evidentes. A mortalidade media dos porcos não vaccinados e atacados de rouget é de 25% ; ao passo que para os vaccinados é apenas de *um* por cento. Fazendo-se uma especie de môlho com os musculos de coêlhos hypervaccinados obtem-se uma sorte de serum que é preventivo e póde mesmo algumas vezes curar os animaes contaminados, nos casos em que o molestia está apenas em começo. Esta immunidade, porém, não persiste.

O microbio do *rouget* tem tanta similhança com o da *septicemia do rato* que quasi torna-se impossivel differencial-os. Os symptomas são os mesmos nas duas molestias e as culturas têm a mesma apparencia ; somente, em caldo, o microbio da septicemia dá prolongamentos, por ventura

ainda mais tennes, do que os da outra molestia. O germen da septicemia é aero-anaerobio e é muito mortifero para os ratos, mas não mata os pombos, e injectado no porco só lhe causa lesões locaes. Durante algum tempo quiz-se confundir todas as molestias do porco conhecidas pelas denominações de *rouget*, *mal vermelho*, *purpura*, *erysipela*, *urticaria*, emfim todas as molestias contagiosas do porco, com a pneumo-enterite infecciosa que ataca esse animal e é uma doença « contagiosa, virulenta, inoculavel devida a uma bacteria ovoide, e caracterisada clinicamente pela presença de fócos inflammatorios no pulmão e intestinos » (Nocard). A diarrhéa acompanha sempre o desenvolvimento da molestia, notando-se ás vezes manchas vermelhas ao redor das orelhas do animal e ainda em outros logares.

O diagnostico differencial entre o *rouget* e a *pneumo-enterite* do porco, em certos casos duvidosos, firma-se injectando-se os productos pathologicos em animaes. Com effeito: o rouget *mata* o coelho e o pombo; mas *poupa* o cobayo. A pneumo-enterite, pelo contrario, *mata* muito rapidamente o cobayo, mas *poupa* o coelho e o pombo.

A molestia tem uma synonimia muito variada nos diversos paizes: em França è conhecida por *pneumo-enterite* (Cornil e Chantemesse) ; na Inglaterra *infectious-pneumo-enteritis* e *swine fever* (Klein) ; na Allemanha *Schweineseuche* (Lœffler e Schuetz) ; na Suecia *svinpest* (Selander) ; na Dinamarca consideram-na a *diphteria do porco* ; nos Estados Unidos *hog-cholera* (Salmon) ; *hog-fever* (Law) e *swine-plague* (Detmers). Certos anthores querem ver uma differença entre algumas d'estas denominações, que designam, segundo elles, molestias diversas ; mas os trabalhos recentes de bacteriologistas de varias nacionalidades estão de accordo sobre a unicidade da molestia.

No começo o mal produz congestão para os pulmões

e intestinos; os folliculos inflammam-se, as placas de Peyer ulceram-se e a diarrhéa não tarda a vir. Nos pulmões encontram-se verdadeiros derramamentos serosos e em certos pontos ha hepatisação.

No campo do microscopio divisa-se um bacillo ovoide parecendo um *coccus*, ou melhor, um cocco-bacillo, que não pode ser confundido com outros; elle não toma o *gram*, mas acceita bem a thionina.

Nas formas chronicas a diarrhéa não cessa e a autopsia deixa ver falsas membranas, sob as quaes a mucosa ulcerada apresenta uns pontos amarelladas.

O microbio injectado reproduz a molestia. Absorvido pelas vias digestivas causa diarrhéa e, a menos que as doses sejam enormes, em geral elle não mata, quando introduzido pela via gastrica.

Cultivado em caldo deixa o liquido turvo; em agar nota-se uma camada humida e bastante espessa; e sobre gelatina apresenta-se em colonias de aspecto mucoso. O bacillo é dotado de movimentos, com especialidade nas culturas novas; elle pode matar rapidamente um coêlho e n'esta especie a sua virulencia exalta-se por meio de passagens successivas. Na primeira passagem os microbios encontrados no sangue do animal são um pouco longos; mas nas seguintes, quando a sua virulencia já é mais elevada, elle volta á forma curta; é n'este estado de grande exaltação que o microbio mata em quatro ou cinco horas um coêlho, produzindo-lhe polyuria e paralysia. O animal deita-se, solta um grito e logo depois morre.

Este mesmo virus evolue no porco muito mais lentamente: é preciso cerca de uma semana para chegar á terminação fatal, e muitas vezes o animal escapa.

Aquecendo-se a 58° um pouco de sangue de um coelho morto de hog-cholera, todas as bacterias morrem; si o liquido fôr, para maior segurança, filtrado na vela Chamberland, matará, na dóse de meio, ou de um centimetro

cubico, um coêlho, produzindo-lhe todos os symptomas da molestia aguda. Entretanto si o liquido fôr aquecido a 70, as suas propriedádes modificam-se e os animaes sensiveis o supportarão em doses elevadas, ficando, porém, os coêlhos cacheticos. Selander injectou pequenas dóses d'esta toxina e foi progressivamente augmentando-as até uma quantidade tal, que injectada a primeira vez mataria com certeza o animal. Se n'esse momento lhe injectarmos um virus muito activo o animal resistirá ; succumbirá, porém, se lhe ministrarmos uma dose sufficiente de toxina.

Isto quer dizer que a immunisação contra o virus do *hog-cholera* apparece muito mais cedo do que a immunisação contra a sua toxina ; porque *virus* e *toxina* são cousas diversas, conforme veremos opportunamente.

O professor Metchnikoff demonstrou que o serum dos animaes hypervaccinados pelas toxinas possue qualidades preventivas, e que a vaccinação praticada com este serum pode ser efficaz, já havendo mesmo se dado o contagio. Todavia o serum não tem acção sobre as toxinas.

Quiz-se estabelecer uma distincção entre o *hog-cholera* e *pneumonia infecciosa* ; mas sob o ponto de vista bacteriologico tal distincção é um pouco phantasista, e é o caso de lembrar que o bacillo pode ter duas virulencias, produzindo effeitos clinicos um pouco differentes, sobretudo exercendo sua acção sobre orgãos diversos. Ainda póde-se admittir que um mesmo germen tendo duas portas de entrada, em uma vez entra pelas vias respiratorias e em outra pela via digestiva. N'este caso as ligeiras variações clinicas não podem ser devidas ao modo de penetração do germen na economia ? — Segundo o professor Roux não se deve fazer distincção entre os germens das duas molestias, ou melhor : entre as duas formas da molestia.

O hog-cholera ou pneumo-enterite do porco é mais frequente do que o rouget, na America do Norte. Os medicos d'aquelle paiz muito têm estudado a molestia ; mas a des-

peito dos trabalhos de Salmon e de outros, não se conhece ainda a vaccina contra a *swine plague*, como já possuimos uma contra o rouget; entretanto em Cincinnati e Chicago são enormes os prejuizos provenientes d'aquella primeira molestia.

MORMO

SUMMARIO— «Mormo» nos equideos e no homem. — «Mormo e farcino.»—Formas da molestia.—Symptomas e lesões.—Contagio. —Trabalhos de Rayer.—Bacillo do mormo : sua cultura.— Experiencias de Nocard. — Attenuação do virus.— Productos toxicos do bacillo.— A *malleina*.— Injecções nos animaes : reacções caracteristicas.—A *malleina* fixa o diagnostico nos casos duvidosos.— Natureza e propriedades da « malleina».

O « mormo » é uma molestia que ataca de preferencia os equideos, mas que póde-se communicar ao homem e a outros animaes. Quando a molestia manifesta-se nos orgãos internos e ataca as fossas nasaes, recebe o nome de *mormo* propriamente dito; quando ella ataca unicamente os orgãos externos toma a denominação de *farcino*, que tanto no homem como no cavallo, não é mais do que a manifestação cutanea do mormo.

No cavallo o farcino reveste a forma aguda ou chronica ; a primeira, muito mais rara do que a outra, traz uma grande elevação de temperatura ; apparece de repente uma inchação em um dos membros, a qual desapparece do

mesmo modo, deixando porém em seu logar uma erupção composta de botões, que não tardam a amollecer e ulcerar-se, complicando-se muitas vezes de phagedenismo. Os vasos lymphaticos inflammam-se e as ulcerações pódem ser em grande numero e d'ellas succumbir o animal.

Quando a molestia apparece sob a forma chronica apresenta uma serie de elevações disseminadas pelo corpo; essas elevações deixam escapar, pela ulceração que não tarda a apparecer na sua parte central, um liquido viscoso, a que dão o nome de «oleo de farcino». Destes pontos ulcesados partem traços de lymphangites constituindo «a corda rarcinosa», que vai terminar nos ganglios, que por sua vez são duros e engorgitados, porém sem nenhuma tendencia á fuppuração.

O mormo, isto é: a outra manifestação do mal, póde igualmente ser agudo ou chronico. No primeiro estado a temperatura sóbe ás vezes até 42°. Uma especie de corrimento *(jetage)* muco-purulento, côr de ferrugem, sanguinolento, faz-se pela venta do cavallo; apparecem sobre as narinas umas pequenas saliencias, que transformam-se em pustulas e por fim em ulceras. Logo após vem a dyspnéa, indicando que os pulmões foram invadidos pelo mal. Ha derramamento nas pleuras e nas articulações, grande esgotamento e a morte põe termo ao soffrimento do pobre animal, quando a molestia não tem de passar ao estado chronico, o que é o caso mais commum. Este estado caracterisa-se por um corrimento chronico rebelde, ulcerações nasaes e engorgitamento de ganglios: na mucosa nasal percebem-se ulcerações, ou então «cicatrizes estrelladas» muito importantes para o diagnostico. No espaço comprehendido entre os dous ramos da maxilla inferior (*auge*) como chamam os francezes, apparece uma glandula endurecida, cheia de bossas, sem tendencias a suppurar, que os veterinarios consideram de alto valor para o diagnostico, ainda mesmo que seja essa glandula o unico signal notado.

As lesões encontradas, autopsiado o animal, são ca-

racteristicas. No estado agudo do mormo o pulmão é o orgão mais compromettido: infarctus, nucleos pneumonicos, deixando correr puz ao córte ou á simples pressão, derramamento nas pleuras e espessamento dos tecidos. Encontram-se tambem no pulmão tuberculos amarellos, ou translucidos, cercados de uma zona congestiva; na forma chronica dá-se a evolução completa d'esses tuberculos. Na mucosa pituitaria vêm-se ulcerações que estendem-se pela trachéa, pelos grossos bronchios e até pelos de menor calibre.

O mormo é muito contagioso e o homem está sujeito a contrahil-o por intermedio do muco-catharro nazal do cavallo, do puz das ulcerações, do succo das glandulas, das lesões pulmonares, etc. Os individuos que tratam dos animaes estão muito expostos ao contagio do farcino ou do mormo.

No homem o farcino caracterisa-se pelos cordões de lymphangite, sobre os quaes apparecem as ulcerações. Quando a molestia tem sido inoculada na face é mais grave do que em outra qualquer parte; no estadochronico o farcino dura muito tempo e póde terminar pela cura.

O mormo apresenta-se no homem acompanhado de abcessos subcutaneos ou intra-musculares, que acabam por ulcerar-se. Ha febre intensa, ulcerações das fossas nasaes, estado geral grave seguido de morte em poucos dias. A forma chronica póde durar annos.

Foi estudando o mormo humano em 1837, que Rayer demonstrou a identidade da molestia no homem e no cavallo. Mais tarde outros fizeram inoculações de uns a outros animaes. O asno é de todos o mais sensivel e é considerado o melhor «reactivo» para o mormo agudo. Eis a maneira de inoculal-o:—cortam-se os pellos da fronte do animal, praticam-se sobre a pelle escarificações verticaes e parallelas; deixa-se correr um pouco de sangue e esfrega-se a região com um chumaço embebido do puz suspeito. Alguns dias depois a temperatura sobe, os vasos lympha-

ticos inflammam-se e vêm por fim adenites multiplas: nos pontos inoculados apparecem as ulcerações, de onde transuda um liquido purulento. O animal póde morrer dentro de cinco ou seis dias, sendo muito raro que elle viva mais de quinze dias.

Tambem aquelle animal póde apresentar o mormo chronico. Cita-se o caso de Arloing, que tendo inoculado em um jumento productos duvidosos, e só tendo obtido uma reacção muito insignificante, acreditou não ter inoculado o mormo. Mas o animal, tendo sido mais tarde e por um outro motivo sacrificado, todas as lesões da molestia foram encontradas no pulmão.

O cão resiste, mas afinal adquire o mormo por inoculação.

O cobayo serve para fazer o diagnostico rapido da molestia, que é acompanhada de sarcocéle agudo, sobretudo se ataca os cavallos de sangue. Esta propriedade foi utilisada por Straus, que inoculou cobayos machos no peritoneo e conseguio ver desenvolver-se sempre n'estes pequenos animaes o sarcocéle agudo.

O microbio do mormo foi descoberto, quasi que ao mesmo tempo, por Bouchard, Capitan e Charrin em França, e por Schuetz e Lœffler na Allemanha. O bacillo encontra-se em todos os productos mormosos; no corrimento nasal e onde elle é mais raro e vem de mistura com outros germens; tem a forma de bastonêtes com as extremidades arredondadas e nada tem de caracteristico; toma e perde facilmente as côres. Nos abcessos amarellos são os bacillos um pouco mais abundantes.

Depois de fixada a preparação é preciso coloril-a pelo azul de Lœffler, ou pela fuchsina de Ziehl, ou ainda pelo azul de «toluidina,» que são as côres que o bacillo recebe melhor. Com a thionina e o alcool elle conserva uma côr avermelhada.

Nos cortes de tecidos encontra-se o bacillo em grande abundancia, quando as lesões são agudas; é raro, porém,

e difficil de achal-o nas lesões antigas. Os tuberculos mormosos teem uma grande analogia com os da tuberculose; mas distinguem-se dos tuberculos d'esta molestia pela auzencia de cellulas gigantes; são antes detritos cellulares constituidos por leucocytos polynucleares degenerados: é no meio d'estes detritos que estão os bacillos amontuados; ahi o processo do alcool e da thionina deixa ver os bacillos coloridos de vermelho e os restos de cellulas de azul.

Não é difficil obter-se culturas do bacillo, tirando-o dos tuberculos, onde elle existe quasi no estado pureza, e semeando-o directamente em qualquer meio que possa supportar a temperatura ordinaria da estufa; sem esta temperatura o microbio não prolifera. O meio liquido que mais lhe convem é caldo peptonisado, contendo 4% de glycerina.

Em gelose, semeado por estrias, apparecem pequenos pontos brancos que nada têm de especial; sobre batata, porém, a cultura é caracteristica: a tuberosa torna-se acinzentada e vai escurecendo até ficar preta; na superficie notam-se traços pardacentos que vão tomando um matiz mais carregado, chegando até a côr do chocolate. E' preciso que a batata não seja acida, e a de côr amarella ainda fornece melhores culturas.

Isolado e cultivado o bacillo, é ainda necessario para fixar o diagnostico, inoculal-o em animaes. Do corrimento nasal ou muco expellido pelas narinas dos animaes doentes inocula-se um pouco sob a pelle de um cobayo (nunca no peritoneo) porque os microbios associados poderiam produzir uma peritonite mortal, antes do germen mormoso desenvolver-se. Em seguida nota-se uma nodosidade que amollece no centro e é acompanhada de adenite. Faz-se a ablação do ganglio, que depois de triturado e diluido em caldo é então inoculado no peritoneo de um segundo cobayo; dous ou tres dias mais tarde desenvolve-se uma orchite e o pequeno animal morre antes do primeiro que

tinha sido inoculado sob a pelle e que lhe forneceo o germen do mal.

O coêlho resiste muito mais do que o cobayo. A inoculação subcutanea é acompanhada de uma nodosidade *in loco*, mas sómente depois de dous ou trez mezes é que se faz a generalisação, escapando ainda assim o animal.

O cavallo e o asno, já vimos que têm grande receptibilidade. Os felinos podem adquirir o mormo e já temse observado liões contaminados, por terem sido alimentados com a carne de animaes doentes, Os cães são quasi refractarios: apenas obtêm-se ulcerações locaes que não se generalisam.

O bacillo do mormo cultivado perde logo sua virulencia e morre sem dar germens, de maneira que é preciso todos os quatro ou cinco dias fazer novas culturas sobre batata. E' pois um microbio muito franzino que morre pela desceccação, pelos antisepticos fracos e pelo calôr a 60 gráos.

As esponjas com que lavam as ventas dos cavallos, e esta pratica é de uso geral e frequente em toda a Europa, transportam o germen de uns a outros animaes.

Nocard demonstrou que o mormo é muitas vezes transmittido pela via gastrica, tendo por origem os bebedouros communs a muitos animaes. E' assim que elle dissolveu um pouco de virus em um balde d'agua, que foi absorvida por um cavallo, e este no fim de oito dias apresentou os primeiros symptomas da molestia.

O virus do mormo attenua-se facilmente. Pode-se tambem exaltal-o por meio de passagens atravez de series de animaes, como fez Gamaleia tomando para substratum o *spermophilo*; o virus ficou com uma actividade capaz de matar um coêlho.

E' conhecida a experiencia de Protopopoff: elle inoculou o mormo nas veias de um coêlho; depois da morte d'este inoculou um segundo, depois um terceiro e assim

por diante, conseguindo afinal matar um coêlho sobre dous inoculados, com uma ou duas gottas de uma diluição de cultura em caldo. Este virus assim exaltado para o coêlho, o é tambem para os outros animaes.

— Será possivel immunisar-se um animal contra o mormo? Straus mostrou que injectando-se nas veias de um cão uma pequena quantidade de uma cultura hypervirulenta, ou mesmo sob a pelle, o animal morre rapidamente. Levando mais longe as suas experiencias elle ainda mostrou que as injecções feitas com as velhas culturas davam apenas a molestia, mas o animal se restabelecia; entretanto inoculado de novo sob a pelle, o cão ainda apresentava uma lesão local; é que esta immunidade era apenas relativa.

Finger e Zakharoff tambem fizeram tentativas repetidas para immunisar os animaes contra o mormo, mas nada obtiveram de positivo; e de todas as experiencias conclue-se que si não pode se ainda immunisar um animal qualquer, pode-se contudo diminuir-lhe a resistencia.

O bacillo do mormo dà nascimento a productos toxicos; o veneno pode ser retirado de uma cultura muito virulenta feita em caldo. Aquece-se a cultura a 100° e evapora-se até que o liquido fique reduzido á decima parte do seu volume; filtra-se e obtem-se um producto escuro, de composição muito complexa que a glycerina torna viscoso; é a *malleina*, que tem propriedades analogas as da tuberculina.

A *malleina* quando injectada em um animal doente de mormo provoca uma reacção caracteristica, ao passo que nos animaes sãos a reacção é insignificante. A grande reacção traduz-se por um edema consideravel, duro, doloroso, no ponto inoculado, e por uma elevação de temperatura superior a dous gráos.

Estes phenomenos são de um auxilio preciosissimo para o diagnostico precoce do mormo latente. Emprega-se a «malleina» diluindo-se um centimetro cubico do producto

bruto em nove centimetros cubicos de agua phenicada a 5/1000; d'esta diluição emprega-se 2 1/2 c. cubicos em um cavallo. A temperatura do animal deve ser tomada dias antes da injecção para ser comparada com os resultados obtidos nos dias subsequentes.—Pouco depois da injecção apparece um calefrio, que é seguido de febre; oito ou dez horas mais tarde o augmento de calôr é consideravel.

Compara-se a temperatura normal com a mais alta elevação observada após a injecção e, si a differença é de menos de 1°,5, o animal deve ser tido como suspeito; si a differença é de mais de 1°,5 o animal está com certeza atacado de mormo.

—Cada vez que um animal reage á «malleina» deve ser abatido?— pergunta o Dr. Roux. E' uma questão muito discutida actualmente na Europa. A legislação sanitaria de varios paizes, entre elles a França, assim o determina.

Entretanto o Dr. Roux pensa que se os cavallos doentes fazem parte de uma grande agglomeração como a de um regimento, de uma companhia de transporte, etc., os animaes contaminados devem ser sacrificados; mas se os cavallos são pouco numerosos e sendo o isolamento praticavel, dever-se-á tentar a cura, que pode ter logar em alguns casos, ao ar livre, no campo, durante alguns mezes. O mormo é curavel em suas formas benignas, formas que só poderam ser conhecidas depois da descoberta e emprego da malleina.

Ainda a malleina é muito util para o diagnostico do pseudo-mormo; de facto: muitas lesões externas têm sido confundidas com as do farcino e a malleina não reage n'estes casos. A substancia chimica da malleina é mal conhecida; mas as suas propriedades são analogas as da tuberculina. Ella resiste á ebullição; unida á glycerina conserva por muito tempo suas propriedades; precipita-se pelo alcool, e purificada torna-se menos activa. A malleina foi preparada pela primeira vez fazendo-se uma mistura de corpos

do bacillo com glycerina, o que dá em resultado uma solução clara, que precipita-se pelo alcool e contem um pouco de materias albuminoides; parece, portanto, que esta toxina não pertence á classe das albumoses. A malleina é mais nociva do que a tuberculina, quando injectada nos animaes são.

TETANO

SUMMARIO.— O tetano é contagioso.— Observações clinicas. — Experiencias : inoculações.— Descoberta do bacillo.— Kitasato isola o microbio.— Morphologia.—Esporulação.— Coloração.—Culturas.— Resistencia do bacillo. — Isolamento.— Toxina.— Immunisação.—O serum anti-tetanico : acção curativa e acção preventiva.—Resultados obtidos.

O facto observado nos hospitaes, de individuos de molestias diversas contrahirem o tetano, occupando successivamente um leito onde havia estado, ou fallecera um doente d'aquella molestia, já tinha, ha alguns annos atraz, chamado a attenção dos medicos e despertado a suspeita vehemente de que o tetano era contagioso. As observações multiplicaram-se n'este sentido e registraram-se series até de cinco pessôas occupando o mesmo leito e adquirindo successivamente o tetano.

Os veterinarios, por seu lado, observaram tambem series muito extensas nos animaes, logo apoz a castração dos mesmos, em turmas mais ou menos numerosas, particularmente nos cavallos, especie em que a molestia era commum. D'ahi nasceo a ideia da origem equina do te-

tano, hypothese que nos ultimos annos deu logar a varios escriptos e pesquizas. Uma noção ficara no animo dos investigadores:—que as feridas das extremidades eram as mais sugeitas a dar a molestia, e si ellas vinham sujas de terra, esterco, ou continham corpos estranhos provenientes do sólo, o caso era particularmente grave, no que dizia respeito ao apparecimento muito provavel do tetano.

Do terreno da simples observação dos factos clinicos passou-se para o campo da experimentação, onde desde logo ficou demonstrada a transmissibilidade da molestia e a sua natureza infecciosa. Foi no anno de 1884 com effeito que Carle e Rattone demonstraram o contagio incisando uma pustula de acne, que tinha sido a porta de entrada ou a origem do tetano em um individuo, injectaram o producto na bainha do sciatico, no canal rachidiano e nos musculos dorsaes de coêlhos em numero de 12, conseguindo communicar o mal a 11 d'aquelles animaes.

No anno seguinte, em Goettingen, Nocalaier assignalava a presença de um germen estranho, um bacillo muito delgado, no meio do puz retirado do ponto das inoculações que elle fazia em varios animaes, para demonstrar a virulencia da terra, á qual elle attribuia um papel etiologico no desenvolvimento do tetano.

Nicolaier conseguio fazer com aquelle puz diversas passagens de coêlho a coêlho e obteve culturas impuras, é verdade, mas que matavam até a septima geração.

De novo, em 1886, foi o bacillo de Nicolaier encontrado na ferida de outro individuo fallecido de tetano. Rosenbach inoculou productos d'aquella ferida e communicou a molestia a ratos, coêlhos e cobayos; foi ainda aquelle experimentador quem pela primeira vez chamou a attenção para a morphologia do microbio, que affecta a forma especial de *alfinete* ou de «vaqueta de tambor.»

Sómente em 1889 póde-se isolar e cultivar o bacillo do tetano, cabendo esta tarefa ao distincto bacteriologista japonez Kitasato, que então fazia a sua educação technica em

Berlim, sob a direcção de Behring; elle fez um estudo completo do bacillo, sob o ponto de vista de sua cultura, morphologia e acção sobre os animaes. Na França fizeram estudos importantes sobre o mesmo assumpto Sanchez de Toledo e Veillon, Vaillard e Vincent e Rouget.

O microbio é encontrado ora sob a forma esporulada, ora sem espóros. Nas culturas recentes elle tem a forma de pequenos bacillos muito finos e alongados, com as pontas ou extremidades arredondadas, apresentando uma ligeira mobilidade; na auzencia do oxygenio os movimentos são flexuosos, lentos, e cessam quando os espóros se formam.

Nas culturas de 3 ou 4 dias, a 37° de temperatura já encontram se formas esporuladas, e no decimo dia quasi todos os bacillos têm espóros; mas se a cultura é mantida sob a acção de um calôr de 20 a 25 gráos a esporulação faz-se tardiamente, começando lá para o decimo dia. Nos bacillos esporulados uma das suas extremidades apresenta uma pequena esphera que lhe dá o aspecto de um *alfinete*.

As côres basicas da anilina convêm ao bacillo, que tambem toma o *gram*. Quando só ha espóros os bastonêtes e o contorno do espóro guardam a coloração: o centro fica incolor dando ao microbio a forma muita caracteristica de uma palmatoria.

O microbio é anaerobio, sem ser todavia muito sensivel ao oxygenio, como outros anaerobios; tanto assim que elle póde habituar-se a viver em um ar pouco rarefeito. Apezar disso, porém, o melhor é fazer culturas anaerobias. A temperatura que lhe convem está comprehendida entre 14° e 43°, mas a sua temperatura optima é a de 38°. Em caldo de carne recentemente preparado, a28° e mesmo a 29°, em um tubo de Roux, o bacillo prolifera: dentro de 24 horas o meio turva-se e nota-se o desprendimento de pequenas bolhas de gaz, que do fundo do vaso sobem á superficie do liquido. Mais tarde, uns 15 dias depois, forma-se um precipitado e o liquido n'esta occasião torna-se claro e deixa escapar um

cheiro desagradavel, que muitos comparam ao da carne queimada.

Em gelatina faz-se uma cultura profunda em um tubo privado de ar, de modo que a agulha penetre nas ultimas camadas do *substratum*. Depois de alguns dias a gelatina começa a liquefazer-se e no fundo do tubo apparece um deposito floconoso, acima do qual o meio conserva-se limpido. Em gelose, em serum coagulado, em leite, o bacillo de Nicolaier prolifera. Sobre batatas, collocadas nos tubos de Roux para as culturas dos anaerobios, o microbio desenvolve-se com muita lentidão : forma-se uma camada fina humida e luzidia, parecida com as culturas do bacillo typhico.

Grande é a vitalidade do microbio do tetano, que offerece muita resistencia aos diversos agentes de destruição ; de facto o espóro resiste durante duas horas a 80° de calôr humido ; entretanto a agua a 100° mata-o em oito minutos. Os espóros seccos, misturados com terra e guardados ao ar livre, mas ao abrigo da luz, conservam durante mezes a sua virulencia. A irradiação solar ou a luz diffusa modificam profundamente a maneira de germinação do bacillo, que perde a faculdade de esporular e deixa de ser pathogenico. Resulta das experiencias feitas por Vaillard e Vincent que o microbio quando exposto na superficie do solo ás causas de destruição, desapparece logo, ou attenua-se.

O germen póde ser procurado, ou na terra, especialmente nas terras dos jardins onde elle abunda, ou, no puz e em outros productos das feridas tetanicas. Para obtel-o e isolal-o dilue-se um pouco de terra e inocula-se em um cobayo ; morto o animal procura-se o germen no logar da inoculação, porque o bacillo de Nicolaier *não se generalisa :* no sangue nunca é elle encontrado, excepto quando se tem inoculado grandes quantidades de culturas nas veias ou no peritoneo do cobayo. Recolhido um pouco do puz ou de outros productos da ferida tetanigera em uma laminula é

preciso colorir a preparação, ou pela fuchsina phenicada ou pelo krystal-violeta igualmente phenicado ; o exame microscopico mostrará o bacillo esporulado ou não. Deve-se fazer um grande numero de preparações, porque ás vezes ha tão poucos germens e ainda assim de mistura com outros, que torna-se difficil descobril-os.

Pelo facto de não se encontrar o bacillo de Nicolaier em uma preparação examinada ao microscopio, não se deve concluir pela não existencia do germen, diz Besson. Submette-se o puz á prova das culturas, semeando o em caldo de carne, ou mantendo a cultura no vasio a 38 ou a 39° de calor e notando-se então as transformações a que já nos referimos atraz e que habilitarão o observador a formar um juizo seguro.

Quando apezar de tudo o microbio tetanigeno continúa mascarado ou reunido ao vibrião septico, associação que é muito commum, a pesquisa deve terminar pelo isolamento no tubo de Vignal para a cultura dos anaerobios ; aspira-se o conteúdo de um tubo de gelatina semeado com um pouco da cultura no apparelho de Vignal e logo apparecem as colonias isoladas do microbio, caracterisadas por pequenos pontos alvadios formando espheras floconosas, de onde partem raios muito finos e dispostos em forma de borla, que fluctua na gelatina liquefeita.

Inoculando-se directamente o puz suspeito em um cobayo ou em um camundongo (animal muito sensivel) os symptomas do tetano se apresentarão logo depois, se com effeito tratar-se do germen d'esta molestia. E' conveniente saber-se que no tetano experimental as contracções começam ordinariamente pelo grupo de musculos situados no ponto de inoculação e d'ahi vão pouco a pouco compromettendo os musculos visinhos até a sua generalisação completa.

Das culturas do bacillo de Nicolaier, Kitasato e outros, entre os quaes Brieger, extrahiram substancias que tinham os caracteres das ptomainas a cuja acção elles attribuiam os symptomas da molestia ; hoje, porém, está pro-

vado que as ptomainas nada têm que vêr com a toxidade das culturas do bacillo tetanico, cuja *toxina* está bem conhecida e tem sido objecto de estudos muito importantes.

Obtem-se a toxina do tetano do seguinte modo: semeado o bacillo em caldo peptonisado, segundo o modo já dito, deixa-se a cultura durante quatro ou cinco semanas exposta á temperatura de 35° e ao abrigo do ar. Depois d'esse prazo é a cultura filtrada na vela Chamberland, ficando um liquido muito toxico, que injectado na *dóse de 1/4000 de centimetro cubico* mata um ratinho.

A toxidade das culturas póde ser consideravelmente augmentada, tomando-se para *substratum* um meio em que uma primeira geração do microbios já tenha vivido e elaborado seu veneno. N'essas condições a toxina assume uma virulencia espantosa: a *centemillionesima* parte de um centimetro cubico é capaz de matar o rato. A toxina diffunde-se com muita rapidez, como prova a seguinte experiencia: injecta-se um pouco da cultura no ponto em que a absorpção se faz com a maior lentidão, como é, por exemplo, a extremidade da cauda de um rato, e tres quartos de hora depois secciona-se a cauda a uns quatro centimetros acima do ponto inoculado e o animal morre sempre de tetano.

O veneno tetanico tem a carecteristica das diástases ou enzymas, conforme verificaram Knud, Tizzoni e M^{lle} Cattani e Vaillard. Chimicamente as suas analogias mais frisantes são com o veneno diphterico; o calor a 80°, durante 3 horas consecutivas, destroe o veneno tetanico.

Behring e Kitasato não tendo podido immunisar os animaes por meio de pequenas dóses de toxina, soccorreram-se do methodo mixto, que consiste em injectar toxina e trichlorureto de iodo ao mesmo tempo e conseguiram vaccinar coêlhos.

Roux e Vaillard só empregam hoje nas inoculações vaccinaes a toxina addicionada de uma solução de iodo, que constitue, como veremos mais longe, o processo do primeiro d'aquelles bactoriologistas para a diphteria. Apezar dos

aperfeiçoamentos introduzidos na technica da immunisação, muito pouco tem-se conseguido do serum anti-tetanico como curativo, mesmo nos animaes. Entretanto os veterinarios exaltam as virtudes preventivas do serum, que lhes têm permittido operar a castração dos cavallos sem o menor accidente tetanico, muito frequente outr'ora, sómente administrando doses preservadoras aos animaes. No homem os resultados ainda são menos favoraveis; (1) apenas verifica-se que nas formas ligeiras tem-se obtido algum resultado, como aliás sempre succedeu com os tratamentos classicos. Entre outros cita-se o caso de um *garçon* de um dos laboratorios da cidade de Lyon, que tendo-se inoculado accidentalmente na mão com productos tetanicos, logo depois começou a ter contracções nos musculos do antebraço. Transportou-se immediatamente a Pariz e no «Instituto Pasteur» recebeu o tratamento serotherapico anti-tetanico, que foi n'este caso efficaz, ficando o moço curado rapidamente.

Na grande maioria dos casos, especialmente nas formas mais serias da molestia, o serum anti-tetanico tem falhado como meio curativo; ao passo que tem sido util como preventivo aos veterinarios.

---

(1) Ao entrar este trabalho para o prélo chegam noticias telegraphicas de que o Dr. Roux acaba de introduzir um grande progresso na medicina, conseguindo curas do tetano confirmado por meio da serotherapia, segundo se deprehende de tão laconica noticia.

LEPRA

SUMMARIO—Descoberta de Hansen: — O bacillo da lepra: suas propriedades e modo de coloração. — Tentativa de culturas do bacillo.—Inoculação da lepra nos animaes.— O bacillo nos tecidos e orgãos humanos.— Pseudo-tuberculose bacillar.—Tuberculose zoogleica.—Propriedades do microbio d'esta molestia.—Inoculação nos animaes.

A lepra é muito commum em alguns paizes, ao passo que é rarissima em outros, como a França e em geral a Europa central. Cada dia nota-se que a molestia vai conquistando novos paizes e se infiltrando cada vez mais pelas diversas camadas sociaes, sem duvida porque nos tempos modernos muito se tem descurado as medidas de isolamento, tão rigorosas outr'ora, com as *gafarias* que multiplicavam-se e serviam para sequestrar os leprosos do resto da sociedade. Nos ultimos annos porém, ha um movimento em favor da sequestração e n'este sentido trabalham os leprologistas mais authorisados.

Tanto na sua forma tuberculosa como na anesthesica encontra-se um micro-organismo especial, descoberto por Amauer Hansen, e que todos reconhecem hoje ser a causa da lepra. No estado fresco, diz Dubieff que os estudou,

esses bacillos são moveis, o que basta para distinguil-os dos bacillos da tuberculose, com os quaes elles muito se parecem. Alem da sua mobilidade o microbio é quasi rectilineo, comparado ao da tuberculose que é curvo; não dá espóro e possue uma capsula, que nem sempre é possivel distinguir-se. O seu comprimento é de 4 a 6 millesimos de millimetro e a sua largura raras vezes attinge *um* m. de millimetro.

Um dos melhores methodos para coloril-o é o de Ehrlich. As preparações não devem ser montadas no balsamo do Canadá reunido ao chloroformio ou a qualquer essencia: o balsamo deve ser puro e dissolvido no xylol, sem o que o microbio descora rapidamente. Este germen toma o *gram*. Baumgarten propõe o seguinte processo de coloração para o bacillo da lepra: immergir a preparação durante *cinco* minutos a frio no *violêta anilinado*; depois descorar com a solução seguinte:

Alcool absoluto.................... 10 volumes.
Acido nitrico............................. 1 volume.

Finalmente lavar com agua, seccar e montar. O bacillo apresenta-se ao exame microscopico colorido de violêta; emquanto que o de Koch não toma esta coloração.

Entretanto seria necessario, para firmar o diagnostico, fazer culturas do microbio e inoculações ulteriores nos animaes; mas até hoje têm sido infructiferas todas as tentativas n'esse sentido, embora as affirmativas em contrario de Bordoni Uffreduzzi, que nenhum outro microbiologista pode ainda verificar. Os ratos que são refractarios á tuberculose de Koch contrahem espontaneamente uma molestia muito similhante em suas lesões ás que apresentam os coêlhos quando inoculados com o bacillo de Hansen. O facto, porem, é que não foi possivel colher qualquer resultado positivo com as inoculações do bacillo da lepra. No homem tentou-se tambem a inoculação, que foi feita em um condemnado á morte, chamado Keanon, mas nada se pôde apurar d'essa unica tentativa.

O bacillo da lepra encontra-se em grande abundancia nos fócos tuberculosos. Como na tuberculose propriamente dita, os bacillos residem no interior das cellulas epithelioides; entretanto o bacillo de Hansen distingue-se do de Koch por phenomenos de uma proliferação mais accentuada; alem disso elle não faz a cellula passar pela degenerescencia caseosa. Na lepra as cellulas gigantes são raras, emquanto que na tuberculose ellas existem em grande abundancia. O bacillo de Hansen é ainda encontrado em cellulas onde o de Koch nunca chega: nas cellulas nervosas e mesmo nas osseas.

Vimos que o microbio da lepra não produz massas caseosas, mas passa por uma degeneração. Quando accumulados nos vacuolos existentes no interior das cellulas, elles escapam-se por occasião de uma raspagem, de sorte que nas preparações apenas distinguem-se massas que fixam mal as côres.

— A lepra transmitte-se por herança ou por contagio? — pergunta o professor Metchnikoff.

Não se pode ter uma opinião absoluta a respeito, responde aquelle sabio bacteriologista á sua propria interrogação; mas ha todo o fundamento para dizer-se que a morphéa é uma molestia contagiosa, transmittindo-se em condições que nós ainda não conhecemos.

A molestia pode curar-se espontaneamente, maximé em sua forma maculosa, mas deixando sempre traços indeleveis: manchas cutaneas. Muitas vezes tem sido a lepra anesthesica confundida com a syringomyelia, cujos symptomas reproduz ás vezes com extraordinaria fidelidade.

A forma tuberculosa da morphéa, pelo contrario, quasi nunca cura espontaneamente. N'esta forma certos orgãos internos são algumas vezes affectados e tem-se assim uma lepra renal, hepatica, pulmonar, etc.

A tuberculina provoca reacções interessantes sobre os morpheticos: quasi que as mesmas observadas nos tuberculosos. A injecção de productos de ambas as molestias em

cobayos afastará, porém, qualquer duvida entre os dous germens, pois é sabido que o da lepra inoculado não dá resultado, ao passo que o outro nunca deixa de desenvolver-se n'aquelle animalsinho.

A lepra pode ainda confundir-se com a tuberculose cocco-bacillar; mas esta molestia, não é como a morphéa, uma molestia exclusivamente humana (atè hoje, pelo menos) e por isso podemos desenvolvel-a em cobayos, o que não é possivel com a lepra, conforme já vimos. Demais o *cocco-bacillo*, que tem sido bem estudado por Malassez e Vignal, não toma o *ziehl* e tem uma forma ovalar; é disposto em cadeias e desenvolve-se bem em todos os meios, formando massas zoogleicas, que reunidas vão constituir os tuberculos. E' principalmente uma molestia dos roedores. — Ha de certo algumas outras molestias capazes de se confundir com a lepra; isto somente no terreno da clinica, mas nunca sob o ponto de vista bacteriologico.

TUBERCULOSE

SUMMARIO.—A tuberculose é inoculavel.— A molestia é causada por um microbio.—Procura do bacillo nos productos tuberculosos. Coloração. — Inoculação dos productos no cobayo.— Culturas sobre serum e nos meios glycerinados. — Resistencia do bacillo aos diversos agentes.— Tuberculose das aves: particularidades do bacillo:—Variação da virulencia do germen-tuberculoso.— Contagio da tuberculose.—Leite e carne dos animaes tuberculosos.—Passagem do bacillo ao feto.— O bacillo nas poeiras.—Substancias chimicas contidas nas culturas do bacillo. — Tuberculina: sua preparação e propriedades.

Laennec tinha entrevisto o contagio da tuberculose; mas foi a Villemin que coube a gloria de dar a prova experimental do facto, no decurso do anno de 1866. Dous annos mais tarde, em 1868, elle publicou o seu livro notavel onde veem relatadas as experiencias que conduziram o operoso investigador francez a fazer a bella descoberta.

Villemin em suas inoculações systematicas conseguio demonstrar a transmissibilidade da tuberculose, de sorte que

hoje sabe-se que a miseria physiologica, o frio, a humidade não pódem crear a molestia: quando muito são causas adjuvantes ou propicias, no sentido de diminuir a resistencia do organismo e preparar um terreno favoravel ao desenvolvimento do germen.

Si a descoberta de Villemin marca uma era nova para os estudos da tuberculose e firmou definitivamente entre os clinicos o conceito do contagio, cuja noção forneceu á prophylaxia uma orientação differente no modo de considerar os tuberculosos, um progresso não menos importante e de consequencias mais fecundas nos trouxe a descoberta do *bacillo* da tuberculose, feita em 1884, por Koch, que poz em evidencia o germen colorindo-o pelo azul de methyleno, pela vesuvina e pelo pardo de Bismarck.

Este processo um tanto longo, foi posteriormente substituido com vantagens por outros mais rapidos.—Ehrlich emprega o processo de banhos corantes a quente com o «violeta anilinado»; mergulha depois a preparação em um banho acido (solução de acido azotico a um terço por cento) e por fim lava-a com agua. O acido nitrico póde ser substituido pelo acido sulfurico a 5%.

A coloração tambem póde ser feita pelo processo de Ziehl-Nelsen:— immerge-se o corte durante um quarto de hora na fuchsina de Ziehl a frio; mergulha-se durante alguns segundos na solução acida e lava-se; termina-se a descoloração pelo alcool absoluto, até que o corte tenha apenas uma côr de rosa pallida. Lava-se e em seguida mergulha-se a preparação no azul de methyleno. Lava-se. Por fim faz-se agir por alguns instantes o alcool absoluto; depois a essencia de girofle e xylol e monta-se no balsamo.

O Dr. Borrel, chefe do laboratorio do professor Roux recommenda um bom processo, attribuido por elle a Kuhne, excellente para colorir os cortes do pulmão, porque não altera a disposição e a forma das cellulas, como succede ás vezes com os acidos mineraes. Consiste este processo em tratar a preparação pela hematoxylina de Bœhmer ou pela

hemateina durante cerca de dous minutos, lavar em agua distillada e colorir a frio pela immersão durante 15 minutos na fuchsina de Ziehl. Tratar o córte (alguns segundos) pela solução aquosa (a 2 %) de chlorhydrato de anilina. Descorar finalmente pelo alcool absoluto. Por este processo as cellulas de fundo ficam incolores, excepto os nucleos. Para terminar clarêa-se a preparação com a essencia de girofle e xylol e monta-se no balsamo.

E' importante saber-se que o bacillo de Koch toma difficilmente as côres basicas de anilina, mas uma vez colorido, o microbio conserva energicamente a substancia corante, mesmo quando fica em contacto com descorantes poderosos como são as soluções de acidos mineraes.

Quando se quizer examinar um escarro ou o puz de um tuberculoso, deve-se recolher a parte mais densa e fazer duas preparações : uma de fundo em azul, e o microbio em vermelho. Em certas lesões tuberculosas como no *lupus* os bacillos são raros. N'este caso o methodo de Weigert dá bom resultado, mas é preciso ainda fazer inoculações para ter se a certeza do diagnostico. Os bacillos não apparecem ou porque são em pequeno numero, ou porque teem chegado a um estado tal de velhice, que não podem mais ser coloridos.

Ordinariamente o animal escolhido para essas inoculações é o cobayo, que é considerado o melhor reactivo para o bacillo da tuberculose. Com os ganglios d'este animal faz-se uma injecção no peritoneo de um segundo cobayo, que morrerá talvez mais depressa do que o primeiro.

Todas as manipulações devem ser feitas com o rigor anti-septico que exige a technica bacteriologica. Quando se tiver de examinar ou submetter a qualquer experiencia tecidos provenientes de um animal morto, são necessarias certas precauções. Com um ferro em braza queima-se a parte superficial do orgão, do baço, por exemplo, e com um escalpello esterilisado raspa se ou corta-se um pouco da substancia e esmaga-se com uma espatula e areia esteri-

lisadas, de modo a destruir as cellulas, deixando os bacillos em liberdade. Em seguida semea-se em meios especiaes, em serum coagulado, conforme recommenda Koch; este serum será esterilisado pelo processo de aquecimento discontinuo, a 58°.

A cultura é repartida por muitos tubos (50, 100 e mais) porque o bacillo desenvolve-se mal sobre os outros meios e não é conveniente estar mudando de meio. E' muito empregado o serum de carneiro, que, distribuido por varios tubos, deve ser esterilisado na estufa a uma temperatura de 39° bem precisos. No fim de umas tres semanas começam as culturas, que se manifestam por umas escamas na superficie do serum, e vão sempre augmentando durante dous ou tres mezes. Uma vez obtidas as culturas é necessario inoculal-as em animaes, que logo contrahirão a molestia; vistas ao microscopio as colonias apresentam-se grupadas em forma de bigodes.

O professor Roux aperfeiçoou consideravelmente a technica das culturas do bacillo da tuberculose, com o seu processo da glycerina addicionada a outro qualquer meio, o que dá excellentes resultados. O agar com 4% de glycerina fornece um terreno, onde a principio o bacillo cresce mal, mas na segunda ou terceira cultura o microbio desenvolve-se muito bem; forma-se na superficie uma pellicula, que fornece uma bôa semente.

Esta será semeada em caldo glycerinado; tendo-se a cautela de depositar a pellicula na superficie do caldo, onde deve ficar fluctuando, desenvolver-se-á muito bem no fim de 12 a 14 dias e ás vezes até muito mais cedo.

Quando a semente provem dos escarros, deve-se ter sempre em mente as impurezas d'estes, que vêm invariavelmente acompanhados de bacterias vulgares. Kitasato propoz que os escarros fossem recolhidos no momento da expectoração, tendo o doente lavado previamente a bocca com um antiseptico: que o producto fosse recebido em uma

boceta de Petri igualmente esterilisada e depois, então, se fizesse a distribuição pelos tubos de agar gelatinado.

Nos escarros tuberculosos os microbios habituam-se a viver como saprophytas e por isso vivem melhor nas culturas do que os de outra procedencia ; pelo que propoz-se guardar esses escarros em saccos de collodio esterilisado que inoculam-se no peritoneo dos cobayos, onde mais tarde encontram-se grandes quantidades do bacillo em via de desenvolvimento.

Em batata o bacillo desenvolve-se bem si tivermos o cuidado de regar a batata com agua glycerinada. E' preciso alcalinisar sempre os meios. O microbio gosta tambem dos meios vegetaes.

O bacillo da tuberculose só morre a uma temperatura de 65 a 70° e não dá espóros. Deseccado elle só morre a 90°, uma temperatura muito approximada do ponto da agua fervendo á pressão ordinaria. Submettido a este gráo de calor o microbio morrerá dentro de alguns minutos ; ainda assim é preciso que o calôr ou o liquido aquecido atravessem a camada de materia albuminosa que habitualmente protege o bacillo.

O mesmo acontece com os anti-septicos, que só agem com efficacia, quando conseguem vencer esta especie de couraça e entrar em contacto directo com o germen. A proposito convem lembrar que o *sublimado* é um máo antiseptico para o bacillo da tuberculose, porque elle forma um albuminato que até protege o microbio ; para este caso especial o acido phenico é muito superior ao sublimado.

Todas as considerações que precedem applicam-se igualmente á tuberculose dos mammiferos, especialmente a dos bovideos. Quanto á tuberculose aviaria, merece uma noticia especial.

As aves são muito sugeitas a epidemias de tuberculose ; a contaminação dá-se provavelmente pelas vias digestivas. O germen da tuberculose aviaria desenvolve-se nos diversos meios com o mesmo aspecto ; apenas um pouco mais

rapidamente do que a tuberculose humana. As culturas apparecem sob a forma de massas viscosas entre 35 e 40° de temperatura. Inoculadas matam o coêlho mais rapidamente do que as que provêm do homem. O cobayo resiste um pouco mais ao bacillo da tuberculose aviaria, que n'este animal generalisa-se raramente. As gallinhas, por sua vez, resistem muito ao bacillo da tuberculose humana, e Straus diz que inoculando-se-lhes grandes dóses, ellas morrem antes de cachexia do que de tuberculose. Metchnikoff encontrou na tuberculose aviaria cellulas de steptothrix ; mas essas mesmas formas foram tambem encontradas por Fischel na tuberculose humana.—Será o mesmo bacillo ?—E' bem possivel que seja uma raça, uma variedade do microbio, resultante da passagem do bacillo de Koch atravéz do organismo das aves, mas não uma especie differente, como querem Gamaleia e Straus.

A tuberculose é como já dissemos, uma molestia contagiosa ; é um facto hoje bem elucidado e fóra de toda a discussão. A propagação da vacca ao homem póde-se fazer nas condições naturaes. Nocard salientou a frequencia da tuberculose nas vaccas leiteiras em França ; mas o leite só torna-se verdadeiramente perigoso quando ha tuberculos nos peitos do animal ; a mesma cousa succede com a carne muscular, que não deve ser regeitada senão no caso de tuberculose generalisada. Quanto á transmissão do germen, da mãi ao feto é rarissima, conforme resulta das observações extensas de Nocard e de outros que têm aprofundado esta questão.

Das culturas tuberculosas extrahio Koch pela primeira vez uma substancia a que deu-se o nome de *tuberculina*, que não é mais do que uma toxina secretada pelo bacillo. Obtem-se a tuberculina, que a principio tantas esperanças despertou como meio curativo da molestia, de qualquer cultura do microbio em caldo glycerinado. Este veneno tuberculoso contem, alem da tuberculina propriamente dita, todos os principios do bacillo ; junta á glycerina ella

tem uma consistencia viscosa. Quando injectada em individuos tuberculosos ella determina uma forte elevação de temperatura, seguida de queda brusca e morte. Os animaes doentes tambem reagem á tuberculina, mas no estado de saude nada apresentam ; ha, pois, uma substancia particular que actua sobre os tuberculos.

Esta acção electiva fez da tuberculina um reactivo maravilhoso para diagnosticar-se a tuberculose dos bovideos, mesmo quando não existe o menor signal clinico da molestia. Uma tuberculose incipiente que não é suspeitada pelos outros meios de exploração, é revelada pela tuberculina.

Fazendo-se precipitar *um volume* de tuberculina por *vinte volumes* de alcool absoluto, obtem-se um producto, que lava-se no alcool e torna-se a dissolver em agua :—é o principio activo da tuberculina. Para obter-se a tuberculina bruta é preciso precipital-a de novo pelo alcool a 60° ; mas este producto é impuro, porque contem uma materia albuminoide unida á tuberculina, que pode ser d'ella separada por precipitação por meio do acido chlorhydrico.

Depois de purificada é a tuberculina soluvel no alcool, onde o sal marinho precipita-a. Tambem ella pode ser aquecida a 100° ; as suas reacções são numerosas e approximam-se das reacções de certas materias albuminoides.

Prepara-se a tuberculina com os corpos de microbios mortos. Esses cadaveres bacillares encerram ainda outra substancia activa, que injectada nos animaes lhes produz uma cachexia. Straus e Gamaleia encontraram uma substancia *necrosante* que denuncia-se pelo cheiro especial que se desprende da tuberculina : é talvez uma proteina.

Hoje não se emprega a tuberculina no tratamento da tuberculose humana por não ter dado resultado, e nem tambem os clinicos servem-se d'ella para o diagnostico da molestia, que se faz perfeitamente pelos processos bacteriologicos, tão seguros, quanto inoffensivos para os doentes ; mas a tuberculina presta serviços relevantes e incontesta-

veis para diagnosticar-se a melestia nos bovideos, antes que ella se revele por qualquer signal clinico.

Foi o que ficou da importante descoberta do bacteriologista allemão, que tanto barulho fez no mundo, ainda ha poucos annos. E, apezar de tudo não é pequeno o serviço que presta a tuberculina.

PNEUMONIA

SUMMARIO.—A pneumonia é uma molestia infecciosa.— Microbios nos escarros pneumonicos.—Diplococcos lanceolados.—Pneumococco. — Culturas sobre os diversos meios —Acção sobre os animaes.—Organismo encontrado por Pasteur em 1880.— Immunisação por meio da toxina.—Serum dos animaes immunisados.—Ensaio de tratamento da molestia. — Pneumobacillo de Friedlander. — Antagonismo entre este germen e a bacteridia do carbunculo.

A pneumonia tem sido considerada como uma molestia, ora geral, ora local. Em certos casos, nas prisões, nos hospicios de velhos, tem-se observado que a pneumonia affecta formas epidemicas ; em taes condições occorreo a idéa de que talvez fosse uma doença microbiana ; e logo os bacteriologistas poseram-se a procurar o germen do mal nos escarros avermelhados dos pneumonicos.

Talamon em 1883 encontrou um microbio especial que apresentava-se geralmente disposto dous a dous, ao qual elle denominou *diplococco* por causa d'esse agrupamento. E como as extremidades apresentassem mais ou menos a forma de uma lança, elle juntou áquella denominação o termo *lanceolado.*

No tecido pulmonar e mesmo na circulação geral Talamon tambem vio o seu diplococco, tal qual se apresentava nos escarros côr de ferrugem.

Inoculado sob a pelle o microbio não produz grande cousa; mas levado ao pulmão de um coêlho elle determina um exsudato fibrinoso e uma hepatisação do tecido, acompanhado tudo de derramamento para a pleura. As culturas de Talamon eram feitas em uma solução de extracto de carne de Liebig.

Por essa mesma epoca Friedlander publicava uma memoria na qual descrevia um microbio mais alongado do que o de Talamon, reunido tambem dous a dous e em cadeia e que elle encontrara nos escarros pneumonicos e no pulmão doente. No campo do microscopio o microbio mostrava-se cercado de uma aureola incolor ou capsula transparente.

Por sua vez Fraenkel encontrou o mesmo organismo de Talamon, que elle descreve com grande precisão em seus menores detalhes. — Eis-nos em presença de dous microbios que se differenciam por sua forma e sobretudo por suas reacções sobre os colorantes, visto como o de Talamon-Fraenkel toma o *gram*, emquanto que o de Friedlander não o toma.

Qual dos dous é o bacillo da pneumonia? Depois de longas discussões os bacteriologistas poseram-se de accordo e hoje todos reconhecem a especificidade do bacillo lanceolado. O de Friedlander encontra-se as vezes nos pneumonicos, accidentalmente, no segundo plano.

Em 95% dos casos de pneumonia encontra-se o bacillo de Talamon-Fraenkel; ao passo que o outro só excepcionalmente é achado, e isto mesmo no começo da molestia. Casos ha em que apparecem estreptococcos, mas a titulo de complicação.

Para pôr-se em evidencia o bacillo de Talamon-Fraenkel estende-se um pouco de escarro pneumonico em uma lamina, fixa-se e tinge-se rapidamente pelo violeta de gen-

ciana. Os microbios apparecerão com essa côr; ao redor de cada diplococco, sobre o fundo mais claro da preparação, notar-se-á uma zona transparente constituida pela capsula gelatinosa que o cerca, separando-o dos elementos visinhos.

Esta capsula pode-se colorir com um pouco de acido acetico, ficando a preparação ahi mergulhada durante algum tempo. A coloração pelo methodo de Gram dá ao microbio um matiz muito carregado, quasi negro.

Inoculado um animal sensivel, um rato, por exemplo, com uma diluição de escarros pneumonicos, sob a pelle do ventre ou do dorso, o animal succumbirá em menos de 30 horas. No ponto de inoculação nota-se apenas um exsudato muito fraco.

O animal não morre de pneumonia, mas sim de uma septicemia aguda; o microbio é encontrado no sangue e nos orgãos. Basta semear uma gotta do sangue em caldo e levar a cultura á temperatura de 30° gráos para vermos o germen proliferar.

A gelatina não póde servir por causa da temperatura exigida. Em gelose formam-se pequenas colonias transparentes que nunca se alastram. No serum coagulado obtem-se tambem colonias similhantes a gottas de orvalho. Em batata quasi nada apparece.

Visto ao microscopio o microbio proveniente das culturas não apresenta mais a aureola: vêm-se apenas os diplococcos juntos pelas extremidades, ás vezes reunidos em cadeia. Deu-se-lhes o nome *streptococcus lanceolatus* de Pasteur. No serum, porém, o germen conserva a sua aureola. Elle não vive muito tempo nas culturas: morre no fim de 7 a 8 dias; para conserval-o é preciso fazer repicagens. Além disso elle secreta materias acidas á custa do caldo e então é preciso neutralisar o meio para poder-se conservar o germen mais tempo. Em ampoulas fechadas e no sangue o microbio dura, por um prazo mais

longo, mas é indispensavel fazer uma cultura, antes de empregal-o, para que fique mais activo.

Os resultados differem segundo a virulencia e o modo de inoculação. Com effeito nem todas pneumonias affectam a mesma gravidade : com o microbio proveniente de certo pneumonico póde-se matar um rato (e é esse um bom meio de prognostico) ao passo que outro doente dará productos muito menos activo.

Só inocularmos o germen no pulmão do coêlho, veremos feita a autopsia, lesões caracteristicas da pneumonia. O cão soffrendo uma injecção subcutanea apresentará um edema consideravel e grande elevação de temperatura ; e no caso de succumbir o animal encontraremos o microbio no sangue e nos seus orgãos.

O pneumococco já tinha sido descripto por Pasteur em 1881, quando casualmente encontrou-o na saliva de um menino morto de raiva. Elle isolou-o, assignalou a sua capsula e deu-lhe o nome de *organismo com aureola*. Estes factos vêm referidos em sua celebre memoria d'aquelle anno sobre a raiva ; depois elle tornou a achar o seu microbio na bocca de outro menino affectado de broncho-pneumonia. Assim, foi Pasteur o primeiro a descrever o germen e a fixar-lhe os caractéres, estabelecendo tambem que este microbio é aerobio e anaerobio ao mesmo tempo, e mais : que a sua virulencia exalta-se por meio de passagens successivas, antevendo a sua attenuação. Pasteur procurou-o nas pessoas de saude e encontrou-o, sómente elle não ligou-lhe importancia etiologica na pneumonia, deixando-o de lado para proseguir nas profundas investigações que n'aquella epoca o preoccupavam e que deram o brilhante resultado que hoje contemplamos. Frænkel tornou bem saliente a identidade absoluta d'essa bacteria com o pneumococco. Um pouco mais tarde estudou-se a immunisação pelo processo das toxinas. Cultiva-se o pneumococco em caldo aquecido a 65° para matar o microbio, porque este não dá espóros, injecta-se o liquido, filtrado ou

não na vela Chamberland, em animaes e estes morrem de cachexia.

Experimentou-se um outro meio de produzir toxinas mais virulentas; mas como os resultados fossem nullos, occorreo a ideia de operar-se sobre sangue de animaes mortos da affecção. O sangue era esterilisado com algumas gottas de chloroformio e os resultados foram melhores; mas ainda assim era necessario lançar mão de grandes quantidades de toxinas.

Isaeff querendo elevar a actividade das toxinas recorreo ás passagens atravez de animaes e conseguio então vaccinar com esta toxina esterilisando-a pelo chloroformio, pelo calôr e pela filtração. O serum d'esses animaes gosa de certas propriedades e foi proposto como meio de tratamento da pneumonia. Klemperer tendo injectado pneumococcos em um coêlho curou-o com uma injecção de serum. No homem não ha um numero sufficiente de observações para julgar se do valôr do methodo, e a questão continúa e deve continuar a ser estudada.

O Sr. Foa notando que nem sempre a immunisação era obtida emprehendeo novos estudos e chegou a distinguir duas raças do microbio: *os pneumococcos* e os *meningococcos.* Ambas essas raças pareciam-se muito exactamente sob o ponto de vista morphologico e de suas reacções, sendo porém uma mais activa do que a outra.

Todos conhecem a marcha clinica da pneumonia; é uma molestia de crise, a defervescencia tem logar geralmente do setimo ao nono dia. Como é justamente no fim de sete dias que nas culturas feitas *in vitro* os microbios se mostram attenuados, tem-se pensado que a crise da pneumonia corresponde talvez a esta attenuação do microbio no pulmão.

Ainda procurou-se explicar o mecanismo d'essa defervescencia aventurando a hypothese de ter o serum do proprio doente adquirido qualidades antitoxicas e ter por isso um papel n'esse phenomeno.

A anatomia pathologica do pulmão inflammado ensina-nos que a hepatisação vermelha é seguida de hepatisação cinzenta; depois o exsudato parece fundir-se e o fóco pneumonico será talvez n'essa occasião invadido pelos leucocytos, até então afastados d'esse terreno pelas toxinas secretadas pelos microbios. Começa a obra dos phagocytas, devorando as partes solidas do nucleo pneumonico, para que possa elle ser expectorado.

Finalmente resulta de estudos recentemente feitos sobre o sangue que nos casos graves ha hypoleucocytose; ao passo que o contrario nota-se nos casos benignos. A contagem dos globulos brancos constitue até um bom meio de prognostico.

Conforme já vimos, Pasteur encontrou o pneumococco na saliva. Pondo de lado as pessôas que tiveram pneumonia e que d'ahi em diante conservam por um tempo indefinido a bacteria nas suas secreções salivares, encontra-se o pneumococco uma vez em cada grupo de cinco pessoas sãs.

O microbio conserva-se alli em permanencia, prompto para invadir o pulmão, que no estado normal é energicamente defendido contra os micro-organismos pelas cellulas migratorias dos alveolos. —Sobrevenha, porém, um accidente qualquer: depressão, resfriamento, irritação, que embarace a acção defensiva das cellulas migratorias, e a bacteria se implantará impunemente no tecido do pulmão, onde completará sua obra, fazendo evoluir uma pneumonia.

E de facto, parece que as cousas passam-se assim mesmo, como demonstra a seguinte experiencia: - injecte-se o pneumococco na trachéa de um carneiro e elle não contrahirá a molestia; mas se previamente o animal tiver recebido pela mesma via a injecção de uma substancia irritante, a pneumonia desenvolver-se-á quando vier a injecção de pneumococcos. E' portanto este o mecanismo da infecção pneumonica; mas como explicar a expansão epidemica do mal, tantas vezes observada? — Até agora nada

ficou resolvido : mas dos factos expostos vê-se desde já de que lado a questão deve ser abordada.

O pneumococco produz ainda outras affecções : tem-se visto pleuresia com pneumococcos : meningites, otites, peritonites, broncho-pneumonias, que é preciso não confundir com as broncho-pneumonias complicadas de estreptococcos, têm ás vezes por causa o bacillo de Talamon. Ha ainda anginas, endocardites, meningo-encephalites onde encontra-se o mesmo microbio especifico não acompanhado.

O pneumococco de Friedlander é bem differente do precedente : é um verdadeiro bacillo, tendo uma capsula mais extensa do que o outro e não toma o *gram*. Para notar-se a differença convém isolal-o ; para isso inocula-se o germen em um rato : quando morre o animal extrahe-se-lhe do coração uma gotta de sangue e semea-se em caldo, que logo depois começa a turvar-se, signal de que o germen está se desenvolvendo. Em gelatina elle prolifera desprendendo gazes. Aerobio e anaerobio ao mesmo tempo, elle cultiva-se entretanto melhor na superficie dos meios, apresentando culturas chamadas em *cabeça de prego*. Se não ha no meio de cultura materias albuminosas (é o caso do agar) o microbio cresce sem a sua aureola. Cultiva-se muito bem no peritoneo dos pequenos animaes de laboratorio. A sua virulencia exalta-se por meio de passagens successivas. Faz fermentar as materias assucaradas, dando alcool ethylico e acido acetico. Fermenta tambem a glycerina, bem como os acidos lacticos, direito ou esquerdo, conforme o assucar que se lhe fornece. Desprende acido carbonico e hydrogenio : é antes de tudo um microbio fermento.

Ha talvez mais de uma raça d'esse microbio, que apresenta um antagonismo com o do carbunculo, quando injectados sob a pelle da um animal, sem comtudo ter propriedades immunisantes ou curativas.

MICROBIOS PYOGENIOS

SUMMARIO — Suppuração e microbios. — Bacteria do laboratorio de Pasteur. — Frequencia relativa de bacterias no puz: sua procura; coloração.—Puz dos abcessos antigos. — *Staphiloccus aureus*; sua cultura.—Molestias causados pelas bacterias.—Furunculos. — Osteo-myelite.— Pyohemia. — Variação da virulencia. — Substancias toxicas elaboradas pelos microbios. — Erysipela.— Papel pathologico do estreptococco no homem. — Serum anti-estreptococcico. —Pode haver suppuração sem microbio?

A suppuração é um phenomeno dos mais frequentes em pathologia. Outr'ora era corrente a theoria de que o puz vinha de uma irritação especial dos tecidos e que eram os proprios tecidos que o forneciam. Cohneim demonstrou que elle é formado por globos brancos, que são attrahidos para fóra dos vasos sanguineos, constituindo o phenomeno da diapedése.

Logo depois dos primeiros trabalhos de bacteriologia Pasteur pensou em estudar o puz, e de facto em 1878 elle examinando a agua de uma torneira de seu laboratorio, encontrou um pequeno microbio que tratou de isolar.

Este pequeno germen introduzido sob a pelle de um

animal dava a suppuração. N'estas investigações Pasteur era auxiliado por Joubert e ambos foram descobrindo novas especies e variedades, entre outros um microbio a que deram o nome de *bacillo pyogenio* ou gerador do puz.

Examinando puz proveniente de furunculos elles encontraram pequenos grãos reunidos em tulhas, que Pasteur, que não gostava de denominações latinas, chamou *bacille en amas de grain*. Hoje esta denominação foi substituida pela de *staphylococcus* que é correntemente empregada.

Este micro-organismo era encontrado no sangue e sobretudo na zona inflammatoria ao redor dos furunculos, e se estes eram numerosos, os bacillos entravam na circulação geral. Estes estudos foram feitos nos annos de 1878 a 1880. Pasteur examinou tambem o puz da osteo-myelite e encontrou ahi o mesmo bacillo. Elle chamou a osteomyelite muito pictorescamente « o furunculo dos ossos »: —definição de chimico, diziam rindo os cirurgiões do tempo; mas os de hoje ja não riem-se e acham que Pasteur tinha razão.

Hervieu estudando as affecções puerperaes na Maternidade encontrou um microbio de um aspecto especial que Pasteur chamou *microbe en chapelet de grain*, manifestando ainda a sua antipathia pela nomenclatura latina. Examinando os lochios, sempre que n'elles encontrava esses microbios, elle annunciava que ia dar-se uma elevação de temperatura e o seu prognostico realisava-se.

Mais tarde Doléris pesquisando o puz das puerperas encontrou o mesmo germen, juntamente com outros. Continuaram as pesquizas e seguio-se uma serie de novas descobertas, com os trabalhos de Ogston em 1880, de Rosenbach em 1884 e de Passet em 1885, encontrando se sempre os mesmos micro-organismos ditos *bacillos da suppuração*.

O mais frequente d'elles todos é, porém, o *staphylococcus pyogenes aureus*, que é o mesmo *bacille en amas de grain*, de Pasteur. Em seguida vem o *staphylcoccus pyogenes albus*, em todos os pontos similhante ao precedente, menos

nas culturas que não são coloridas. O *microbe en chapelet de grain* passou a denominar-se *streptococcus pyogenes.* Ha ainda um *streptococcus citreus.* Para pôr-se em evidencia estes differentes microbios, estende-se um pouco de puz em uma lamina e trata-se pelas côres da anilina ou pelo methodo de Gram. Certos microbios apresentam-se em liberdade, outros, porém, estão contidos nos globulos do puz. No puz velho, ou nos antigos abcessos encontram-se muito poucos microbios livres e póde-se mesmo não encontrar nenhum ao exame microscopio: mas é possivel fazel-os apparecer, rejuvenescendo-os em uma nova cultura.

Muitos outros microbios podem dar o puz; exemplo: o do cholera das gallinhas, que causa até uma lesão local, e a bacteridia do carbunculo, que injectada sob a pelle de um coêlho bem immunisado, produz-lhe um abcesso. São detalhes que se referem á historia de cada um d'esses microbios.

O *staphylococcus aureus* desenvolve-se muito bem quando semeado pelo processo das estrias em placas mantidas em uma temperatura de 33 gráos. Em gelatina apparecem pequenas manchas e com os progressos da cultura o meio liquefaz-se e as manchas tornam-se amarelladas, as culturas têm o aspecto de uma «bucha de algodão». Na ponta da picada reunem-se grumos amarellados. Finalmente em caldo o liquido turva-se geralmente e observa-se ao nivel, e circulando as paredes do vaso, uma orla de grumos amarellados.

O *staphylococcus albus* encontra-se muitas vezes de mistura com o precedente, com o qual, conforme já vimos tem a maior similhança, menos no que refere-se á materia corante, que falta; mas é preciso convir que é uma differença muito superficial, mesmo porque o *aureus* cultivado ao abrigo do ar produz uma raça destituida de coloração. No mais as culturas fazem-se nos mesmos meios e os microbios colorem se pelos mesmos processos; portanto é licito concluir-se que ambos os germens pertencem á mesma

raça. Ambos são encontrados tanto nos furunculos, como nos abcessos quentes. O Sr. Jassé inoculou em um dos seus braços um *staphylococcus albus* e obteve uma serie de furunculos. Na osteo-myelite encontram se os mesmos organismos, que ainda são vistos nas infecções purulentas, nos abcessos metastaticos e em varias outras affecções.

Tendo-se o cuidado de escolher as especies mais virulentas de culturas puras d'esses microbios, é possivel fazer-se desenvolver nos animaes os mesmos phenomenos observados no homem. Com uma cultura muito energica mata-se um coêlho, sendo o bacillo encontrado nor orgãos do animal ; uma cultura menos activa dará abcessos metastaticos, ou uma endocadite.

Entretanto nem todos os microbios pyogenios têm a mesma virulencia : uns são quasi inoffensivos, outros matam em 24 horas ; estes microbios secretam materias toxicas, e o liquido das culturas privadas dos germens determina uma cachexia.

Rodet e Orkmann fizeram extractos alcoolicos de culturas e observaram o seguinte : que injectados nos animaes, em logar de conferir-lhes a immunidade, exaltava-lhes a receptividade para a molestia, durante semanas e até mezes. Cultivados no ar ou fora d'elle, esses microbios não dão espóros e são finalmente exterminados pelo calôr e pelos antisepticos ; mas deseccados em presença das materias albuminoides (condições que se acham realisadas nas crostas das feridas) elles conservam a sua vitalidade por muito tempo.

O *staphylococcus citreus* differe apenas dos anteriores pela côr e pelo menor gráo de virulencia, porém em tudo o mais se comporta como elles.

O *streptococcus pyogenes et erysipelatis* encontra-se com frequencia no puz. Cultiva-se em gelose, não liquefaz a gelatina, onde desenvolve-se dando o aspecto de grãos presos uns aos outros. Não turva o caldo e os pequenos grãos dispõem se ao longo das paredes do vaso e vão des-

cendo para as ultimas camadas do liquido. Ao microscopio observa-se um germen, muito differente dos precedentes, apresentando-se em forma de rosario.

Os streptococcos encontram-se nos phlegmões, nas infecções puerperaes, nas infecções post-operatorias, nas peritonites das puerperas. Encontram-se ainda complicando o sarapam, a escarlatina, a diphteria e outras molestias, como a broncho-pneumonia das crianças, imprimindo-lhe um cunho de grande lethalidade.

E' principalmente na erysipela que elle encontra-se sob a mesma forma que apresenta no puz; aliás é sabido que esses diversos *streptococci* são um e o mesmo microbio. As experiencias de Vidal deixaram fóra de duvida que os differentes effeitos observados procedem dos diversos gráos de virulencia do microbio; é assim que um streptococco tomado a um erysipelatoso e attenuado, quando mais tarde o injectarmos, dará apenas uma inflammação limitada

Tomemos agora d'esta ligeira inflammação um germen, exaltemos, por meio de cultura, a sua virulencia e teremos a erysipela de novo reproduzida, se o injectarmos.

Si muitos d'esses germens, são como está provado, variedades de uma mesma especie, ha todavia alguns strepcoccos que assim não podem ser considerados. Depois de varias experiencias chegou-se a dividil-os em duas classes: *streptococcus longus e streptococcus brevis;* isto é: em uns os rosarios são compridos, e nos outros são mais curtos. Nos caldos o *longo* não turva o liquido e a cadeia de grãos vae até o fundo do vaso de culturas; o *curto*, pelo contrario, turva o caldo e mantem-se na superficie.

Ha tambem o *streptococcus conglomeratus*, que differe dos outros pela maior virulencia. Knorr affirma que a virulencia está ligada á forma e que pode-se transformar as especies umas nas outras; conseguintemente não se deve ligar muita importancia á morphologia.

O Dr. Marmoreck, medico austriaco ex-alumno do Instituto Pasteur, tem feito ultimamente estudos muito im-

portantes n'aquelle estabelecimento sobre os streptococcos.

Servindo-se de serum humano e de caldo de carne, na proporção de uma parte do primeiro para duas do segundo, elle conseguio exaltar a virulencia d'esses microbios, obtendo ao mesmo tempo grandes quantidades d'elles em culturas de 24 horas.

Um pouco de serum sobre gelose dá uma cultura em que o germen conserva grande virulencia, mas se o serum falta, o streptococco mais virulento retirado do homem perde rapidamente as suas propriedades, Em ampoulas de vidro e ao abrigo do ar elle póde conservar por muito tempo a sua actividade, sobretudo se tem sido guardado na geleira e si se tiver a cautela de antes de empregal-o, mettel-o no liquido a que nos referimos mais acima ; ahi elle remoçará, conservando sua virulencia, sem entretanto exaltal-a. Para conseguir-se este ultimo resultado é necessario fazer passagens sobre coêlhos, intercalando entre ellas uma cultura em serum, No fim de um certo numero de passagens obtem-se uma virulencia capaz de matar o coêlho na dose de um *millionesimo* de centimetro cubico : uma unica cellula parece bastar para produzir a morte. Por esta technica um streptococco banal chegará ao mesmo resultado, o que nos authorisa a pensar que todos os microbios do homem são susceptiveis de ter a sua virulencia exaltada.

Ha ainda outros *streptococci* pathogenios : Nocard descreveo uma *mammite* das vaccas, caracterisada por tumefacção especial das tetas ; o leite é invadido pelo microbio e não tarda a coalhar, emquanto que o assucar n'elle contido transforma-se em acido lactico ; essa molestia, produzida por um estreptococco, é transmittida de umas ás outras vaccas pelos ordenhadores.

Este germen differe do da erysipela porque não dá lugar aos mesmos accidentes.

No *gourme* dos cavallos Schütz encontrou um outro streptococco. O animal é accommettido de angina e os

seus ganglios entumecem, suppuram e ás vezes o animal morre. Este estreptococco do cavallo é pathogenico para o rato, e no cobayo a sua virulencia exalta-se. Ainda ha um outro estreptococco, que encontra-se na pneumonia do cavallo. Todos esses diversos microbios não devem ser confundidos, mas no homem ha motivo para crer que só ha uma unica especie. O estreptococco humano reforçado reproduz nos animaes as molestias peculiares á nossa especie.

Tentou-se immunisar os animaes por meio de injecções de culturas de *streptococci* attenuados. No laboratorio do professor Roux foram inoculados alguns coêlhos com ligeiros traços do microbio; quando o animal restabelece-se apresenta grande resistencia ás inoculações ulteriores, chegando a haver mesmo uma certa immunidade relativa.

Procurou-se tambem obter a immunidade por meio das toxinas. Frænkel aqueceu culturas a 70 e 80° e injectou-as nas veias de coêlhos: alguns soffreram graves accidentes, outros resistiram. As toxinas injectadas produzem cachexia. Rogé aqueceo culturas a 120° e conseguio uma immunidade muito pouco duradoura. O serum dos animaes assim immunisados tem propriedades preventivas.

O Dr. Marmoreck experimentou sobre o carneiro, o cavallo e o asno, injectando n'esses animaes um estreptococco hypervirulento. Nas primeiras inoculações feitas no cavallo notou-se um edema, que não se mostrou mais quando diminuiu se depois a dose a injectar de cada vez. As culturas eram feitas em caldo reunido ao liquido da ascite. Sobre o asno os resultados não foram tão bons. Os cavallos têm ás vezes reacções violentas, mas deixando-se-os reposar por muito tempo o serum adquire propriedades de uma efficacia notavel.

Uma precaução indispensavel é a de não tirar-se o sangue do animal logo depois da ultima injecção: — o serum n'estas condições é perigoso.

Com uma dose correspondente a *quarenta por mil* do peso de um homem, ou de um animal qualquer, consegue-se a immunidade, mesmo intervindo-se algumas horas depois de começada a molestia. No homem pode-se injectar uma ou duas dóses de 10 c. cubicos nos casos de erysipela; o doente experimenta um grande bem estar e a molestia para. Havendo interesse n'isso, pode-se empregar desde o começo grandes dóses, sem haver risco para o doente. Em todos os casos a administração do serum é seguida de queda brusca da febre e a descamação começa. Este serum dá igualmente bom resultado nos casos de phlegmão acompanhado de lymphangite. Se a suppuração não vem logo o serum póde impedil-a; mas se apezar d'isso ella se faz, o abcesso sara de prompto, uma vez aberto; e o estado geral mantem-se excellente. Nas infecções que seguem as grandes operações é preciso injectar grandes quantidades de serum.

O estreptococco é o germen que nos faz mais mal; tambem o *serum* é o medicamento que mais damno lhe causa.

— Pode haver suppuração sem microbios? A questão tem sido muito controvertida; uma escola diz: determinai uma irritação e tereis a suppuração. Outros, com Straus á frente, sustentam que não ha suppuração sem microbio.

O que ha de positivo é que os resultados das inoculações de materias destinadas a determinar a suppuração variam com as especies e com a região em que experimenta-se. Injectando-se mercurio esterilisado sob a pelle de um coêlho não ha suppuração. O mesmo mercurio injectado no olho do animal dará logar á formação de puz. O mercurio injectado sob a pelle do cão produzirá um abcesso; ao passo que o cobayo ficará indemne.

Os leucocytos que constituem o puz têm affinidade para certas substancias, emquanto que repellem outras; os microbios secretam productos que attrahem os phagocytos: o facto está demonstrado pela injecção d'esses productos, que attrahem os globulos brancos para o ponto inoculado.

Emfim estas questões só têm importancia sob o ponto de vista doutrinal; na pratica póde-se dizer que não ha suppuração sem microbios, mas não se deve exagerar esta proposição affirmando que não ha puz sem microbio, porque os leucocytos podem ser attrahidos pela materia antiseptica sem que os microbios ahi appareçam.

FEBRE TYPHOIDE

SUMMARIO.—Bacillo typhico : coloração, isolamento.—Caractéres das culturas sobre os diversos meios.— Cilios vibrateis.—Acção do bacillo sobre os animaes.—Infecção ou intoxicação ?— Veneno typhico.— Immunisação dos animaes.— Serum dos animaes immunisados.—Papel da agua na propagação da molestia.—Conservação do bacillo no solo.—Outros modos de transmissão da febre typhoide.

A febre typhoide mostra-se geralmente sob a forma de epidemias : o seu caracter infeccioso é patente ; e por isso logo que a bacteriologia constituiu-se como sciencia procurou-se o microbio da febre typhoide.

Os primeiros estudos foram feitos por Eberth, que depois de grandes e de numerosas pesquizas conseguio descobrir o bacillo em 1879, quando ainda não eram conhecidos os methodos de coloração de que dispomos hoje ; d'ahi vem um maior relevo para esta importante descoberta.

Em 1884 Gaffky isolou os microbios, que apresentavam-se amontoados em um ponto qualquer dos córtes, cultivou-os e fez inoculações em animaes.

Hoje que possuimos bons methodos de coloração, entre elles o de Nicolle, pela thionina (o bacillo typhico não toma o *gram*) a procura do microbio não é menos trabalhosa. As culturas feitas nas bocetas de Petri apresentam-se ao microscopio sob o aspecto de pequenas manchas brancas, mesmo com um augmento medíocre. Quando os córtes tem sido coloridos, nota-se uma zona azul intenso; no centro da qual distingue-se claramente o bacillo: esta disposição é caracteristica.

Para isolar-se o bacillo dilue-se a polpa do orgão e semêa-se em gelatina sobre uma boceta de Petri. Logo depois apparecem pequenas manchas que vão se estendendo, nunca, porém, liquefazendo o meio. As manchas têm os bordos adelgaçados, circumstancia que produz uma notavel coloração iriada. Com um augmento de 30 diametros distinguem-se na superficie das manchas estrias e vêmse os bordos serrilhados ou recortados; illuminadas de certo modo apresentam as manchas um aspecto especial dito de *ilha de gelo*. Na profundeza da cultura divulgamse tambem pequenas manchas pardacentas, opacas e lisas, que são entretanto constituidas pelo mesmo bacillo.

Algumas vezes não se encontram os bacillos, quando se quer fazer uma cultura com um pouco da polpa de um orgão; do baço por exemplo; basta, porém, guardar a substancia em tubos, e os microbios não tardam a proliferar, mesmo á temperatura ordinaria.

Na gelatina as culturas nunca são muito abundantes e precisam de 48 a 60 horas para se desenvolver. Em gelose e com a temperatura um pouco elevada obtêm-se culturas mais viçosas e que começam a ser visiveis quatro ou cinco horas depois de semeadas.

O caldo ordinario levemente alcalinisado é turvado pelo microbio ao fim de poucas horas, apparecendo dias depois um sedimento que deposita se no fundo do vaso de cultura.

Ao microscopio veem-se corpos mais ou menos alonga-

dos segundo a idade das culturas; no começo são verdadeiros bastonetes de extremidades arredondadas, por fim attingem formas bacillares bem consideraveis.

O methodo de coloração é o da thionina. Em gotta suspensa e sem coloril-os nota-se que elles são dotados de movimentos de rotação e de adiantamento combinados (movimento de carrapêta) mais activos para os bordos livres da gotta; aliás esses movimentos não são peculiares ao bacillo de Eberth; outros microbios os possuem. O bacillo typhico é dotado de cilios vibrateis, bem visiveis quando as culturas são velhas. O microbio de pouca idade é muito pequeno, quasi um *bacterium*. Os cilios ou *flagella* são em numero de 13 ou 14 e desta circumstancia tem se procurado tirar um caracter para differençar o microbio da febre typhoide do colibacillo.

Sobre batata, a 33 e a 37° o bacillo typhico dá uma cultura muito discreta; apenas um traço humido que para ser percebido precisa ser examinado com muito cuidado. As culturas velhas deixam-se colorir pelo processo já indicado; ao passo que as novas não tomam a coloração: é já um elemento de diagnostico. No meio do corpo do bacillo fica sempre um espaço claro, phenomeno este que está ligado ás condições de cultura, que quanto mais velha, maior numero de espaços claros apresenta.

O Sr. Gaffky notando que os espóros não tomam a coloração pensou que nos espaços claros é que elles existiam; mas depois reflectiu que isso não podia ser porque a cultura morre a 58° de temperatura. Esses espaços são devidos a desceccação que soffrem os microbios quando faz-se a preparação sobre laminulas; por outro processo já não se notam essas lacunas. Quanto aos espóros, até hoje não foi possivel descobril-os no bacillo de Eberth, que vive bem tanto no ar, como na auzencia d'elle.

Sendo o bacillo o agente infectuoso da febre typhoide deve-se o encontrar nos doentes d'esta molestia; de facto assim é: procure-se-o no baço que será encontrado.

Gaffky inoculou o microbio em animaes por varias vias e não conseguio demonstrar a sua toxidade. Novas experiencias foram tentadas depois com melhor resultado. Os animaes menos resistentes são os ratos. Com um virus mais activo, capaz de matar um cão ou um coêlho, encontram-se as placas de Payer e os folliculos fechados entumecidos, e em todos os casos vê-se o bacillo nos orgãos dos animaes.

Procurou-se saber de que modo o micobrio mata ;— será por intoxicação ou por uma infecção. Frœnkel, Leitz, e outros acreditam na infecção ; emquanto que Pffeifer e Kitasato pensam que o bacillo age por intoxicação. Chantemesse e Widal observaram a pullulação do microbio no corpo dos animaes e tambem que as culturas esterilisadas matavam o rato ; mas n'este ultimo caso eram precisas dóses muito maiores do que quando ellas continham o bacillo. A verdade, portanto, está entre as duas opiniões.

Aquelles experimentadores observaram que o bacillo generalisava-se : fóra do ponto de inoculação elles encontraram o microbio, que ainda era visto em um coêlho morto no decimo quarto dia de molestia e no embryão de uma femea de cobayo prenhe.

As toxinas matam ; para obtel-as activas é preciso exaltal-as ; eis aqui o processo seguido por Sanarelli : injecta-se sob a pelle de um coêlho um pouco de cultura do bacillo typhico, e, como auxiliar da acção d'este, dez ou doze centimetros cubicos de uma toxina qualquer : a do colibacillo, por exemplo. O coêlho morre apresentando grande abundancia do bacillo de Eberth. Um segundo coêlho é injectado com bacillos tomados ao que acabou de morrer, reforçando-se a injecção com qüatro ou seis c. cubicos de toxina e assim successivamente ; na 30ª passagem consegue-se um virus muito exaltado.

Chantemesse e Widal conseguiram o mesmo resultado injectando o bacillo typhico juntamente com toxinas do es-

treptococco ; injectando-se um centimetro cubico, ou um pouco mais d'essa cultura assim exaltada no peritoneo de um animal os seus effeitos são muito mais energicos : o animal morre em 24 horas, com as lesões intestinaes caracteristicas da molestia. O bacillo typhico é pois toxico-infectuoso ; a sua toxina póde ser preparada esterilisando-se uma cultura pelo calor e filtrando-a sobre velas Chamberland. Esta toxina tem dado logar a muitos trabalhos importantes. Brieger retirou d'ella uma ptomaina.—a *typhotoxina ;* mas não é este o veneno da febre typhoide, cujas toxinas são *diastases.* Aliás o author emprehendeu ultimamente novos estudos.

Sanarelli estudou muito bem esta questão das toxinas da febre typhoide e conseguio-as muito activas ; elle injectava-as na proporção de 1 para 100 do peso do animal, que morria em 24 horas. Logo depois da injecção a temperatura cahe bruscamente em logar de subir, o abdomen torna-se doloroso e apresenta as lesões caracteristicas, depois da morte do animal. Em todo o caso não é fóra de proposito perguntar se esta toxina obtida por Sanarelli, de uma maceração de microbios e depois de tantas manipulações será mesmo a toxina da febre typhoide ?

Conforme já vimos é possivel exaltar-se a virulencia do bacillo typhico. Se injectarmos pequenas dóses de culturas virulentas e se formos graduando essa virulencia progressivamente para mais, consiguiremos vaccinar o animal ; mas esta vaccinação é perigosa : o animal perde muito peso, a ponto de ás vezes succumbir.

Quando o animal tem recebido 15 ou 20 centimetros cubicos do liquido está vaccinado, e esta immunisação o protege contra o bacillo vivo, mas de modo algum contra a intoxicação ou veneno das toxinas.

O serum dos animaes tratados por aquella forma adquire propriedades preventivas ; injectado na dóse de um centimetro cubico em um cobayo, impede-o de morrer. Tambem parece gozar de poder curativo, porque injectado

30

em um animal doente, quando o abaixamento de temperatura não tem ainda sobrevindo, os animaes melhoram consideravelmente.

Pensou-se por esse motivo em utilisal-o no tratamento da dothinienteria, mas o numero de observações colhidas até hoje é muito restricto e não permitte ainda um juizo definitivo sobre o seu valor therapeutico, tratando-se de uma doença muitas vezes curavel, como é a febre typhoide.

Ensaiou-se tambem no tratamento d'esta molestia a injecção de culturas esterilisadas do bacillo pyocyanico; logo depois da applicação observa se um violento calefrio que é seguido de abaixamento de temperatura, o que traz um grande bem estar para o doente. Em todo o caso é bom recommendar toda a prudencia n'esses ensaios.

Como se adquire a febre typhoide?—Os typhoisantes têm uma diarrhéa que contêm os bacillos: estes contaminam a agua; experiencias recentes provam que elles vivem e proliferam n'este meio. De outro lado as observações clinicas contestes não permittem por em duvida esse modo de contagio, isto é: pelas aguas polluidas pelas materias fecaes.

Todavia é extremamente difficil procurar-se o bacillo nas dejecções. A sua similhança com o *bacterium coli commune*, nos excrementos e nas culturas authorisam a duvidar-se do exactidão de pretendidos resultados. O facto do bacillo de Eberth não temer o acido phenico não póde servir de caracter differencial, porque o colibacillo vive muito bem em uma solução phenicada. A alta temperatura é necessaria ao cultivo de ambos os microbios e a reacção do indol ou *cholera-roth* é commum aos dous germens.

Não ha pois nenhum methodo differencial seguro; é preciso aguardar processos novos, posto que saibamos que o bacillo typhico existe nas dejecções dos doentes e chega ao homem são por intermedio da agua.

Em Pariz, sempre que a agua do Sena é ingerida sem

ser previamente fervida, nos quarteis por exemplo, observam-se epidemias de febre typhoide.

Com os methodos actuaes é entretanto difficilimo pôr-se em evidencia o bacillo existente n'agua, apezar dos grandes progressos da bacteriologia. O bacillo conserva-se muito tempo na agua, resiste no gelo, assim como na terra, segundo as observações de Grancher e Deschamps. Entretanto são as observações clinicas que provam melhor esta resistencia do microbio, que ainda póde entrar na economia com os alimentos ingeridos.

Alguns observadores querem ainda que elle nos venha por intermedio das poeiras atmosphericas. Conhecendo-se a sua etiologia mais geral—a agua—e sabendo-se que o bacillo morre a 58° e a 60°, facil é estabelecer-se com segurança a prophylaxia da febre typhoide, o que já satisfaz á hygiene.

O serum antityphico tem uma propriedade notavel descoberta por Durham e estudada mais tarde por Widal: —*a propriedade aglutinante*, que este bacteriologista encontrou no sangue dos doentes de febre typhoide; tirando partido d'este facto elle estabeleceu um processo rapido e certo para diagnosticar a molestia. E' o *sero-diagnostico*.

A *propriedade aglutinante* torna-se evidente quando a uma cultura recente e pura do bacillo de Eberth, feita em caldo, junta-se um pouco de sero proveniente do sangue de um animal immunisado, ou de um individuo doente, ou mesmo curado da molestia; n'estas condições os microbios espalhados pelo caldo reunem-se em tulhas, aglutinam-se, formando grupos compactos onde o bacillo perde a mobilidade, mas continúa a viver. E' nisto que consiste o phenomeno da aglutinação.

O *sero-diagnostico* faz-se recolhendo com as cautelas antisepticas algumas gottas de sangue, extraido por simples picada da polpa do dedo de um febricitante suspeito, logo no 2· ou 3· dia de molestia, junta-se um pouco de cultura do bacillo puro feita em caldo e observa-se o que se passa.

Em 163 casos Widal e Sicard só viram o sero-diagnostico falhar uma unica vez. O sangue póde ser enviado em tubos de vidro para ser examinado a distancia, sem se alterar, mesmo quando vai secco. O facto de não se obter a *aglutinação* não exclue a hypothese de tratar-se de um caso de febre typhoide, constitue apenas uma probabilidade contra a existencia d'essa molestia.

COLIBACILLO

SUMMARIO.— *Bacterium coli commune*: seus caracteres, sua diffusão.— Acção sobre os animaes.—Virulencia variavel.—Acção sobre o homem.—Toxina do bacterium coli.—Immunisação dos animaes.—Serum.—Similhanças entre o coli-bacillo e bacillo typhico.— Distincção entre ambos os bacillos.

Em 1884 Escherich retirou do intestino de um recemnascido um microbio que lhe pareceu tratar-se do bacillo da febre typhoide.

No féto não ha microbio, mas nas primeiras horas que seguem-se ao nascimento apparecem o fermento lactico e o bacterium coli; este então é muito abundante nos meninos que têm diarrhéa. Elle existe em grande quantidade no tubo intestinal do adulto e para obtel-o basta semear uma diluição dos excrementos; mas querendo-se o microbio puro, é necessario fazer a repicagem da cultura.

O germen vive bem em gelatina dando pequenas colonias superficiaes, um pouco mais largas do que o bacillo typhoide, sem liquefazer o meio. Semeado por picadas elle cresce melhor na superficie do que na profundeza. Em gelose cultiva se bem na temperatura ordinaria, dando uma camada mucosa.

Em caldo elle cresce em algumas horas. Examinando ao microscopio em gôtta suspensa elle tem os mesmos movimentos que o bacillo typhico. Em batata cultiva-se facilmente apresentando uma côr amarellada, que depois torna-se parda; emquanto que o bacillo de Eberth dá apenas um traço humido. Finalmente em gelose o bacillo cultiva-se dando bolhas de gaz.

O coli-bacillo encontra-se por toda a parte: nas poeiras atmosphericas, no ar, na agua e até nas fontes julgadas as mais puras. Inoculado sob a pelle de um cobayo ou de um coêlho, quasi que não se obtem nenhum resultado; injectado no peritoneo geralmente o animal succumbe e a morte é muito rapida; encontra-se o microbio no sangue e nos orgãos do animal, que em vida apresenta-se com o ventre destendido e doloroso, tem diarrhéa, havendo um derramamento com deposito fibrinoso na cavidade abdominal. As placas de Peyer ficam entumecidas e o baço augmentado de volume. Se a molestia prolonga-se apparecem suppurações que conduzem á cachexia.

A virulencia do *bacterium coli* varia com a origem do microbio: quasi inoffensivo quando provém de uma pessôa no estado de saúde, elle torna-se perigoso quando extraido de uma dejecção diarrheica; n'estas condições elle mata rapidamente os animaes: é o que acontece no *cholera nostras*. Retirado das suppurações elle é igualmente virulento, sobretudo tratando-se de uma suppuração post-typhica.

Gilbert observou que o bacillo injectado com certo gráo de virulencia exalta-se facilmente por passagens successivas, atravéz de cobayos.

Depois de um ataque de cholera-nostras encontra-se no intestino do homem, grandes quantidades do coli-bacillo, com exclusão, pode-se dizer, de qualquer outro microbio, e por isso tem-se attribuido a esse germen aquella molestia.

No homem elle póde causar ainda suppuração e peritonites; é principalmente nos casos de obstrucção intesti-

nal, nas hernias estranguladas, que nota-se esse facto: acima do ponto estrangulado faz-se a estase sanguinea; o B. coli passa atravêz das paredes intestinaes e invade o peritoneo, onde causa as maiores desordens, por sua rapida e extraordinaria proliferação.

Tem-se encontrado o germen nas anginas, nos derramamentos da pleura, nas suppurações puerperaes, nas suppurações peritoneaes, etc; entretanto isso passa-se com menos frequencia do que succede com o *streptococcus*, que é muitas vezes o seu associado n'essas complicações.

O *bacterium coli* secreta toxinas como o bacillo typhico; o modo de preparação é o mesmo para ambas estas toxinas, assim como os effeitos e symptomas por ellas causados; sómente tratando-se do coli-bacillo as dóses devem ser um pouco mais fortes.

Tudo quanto se refere á immunisação dos animaes e suas consequencias prophylacticas e therapeuticas já foi dito a proposito do bacillo typhico, que comporta-se a este respeito como o coli-bacillo, havendo as maiores anologias entre ambos os germens.

Com effeito morphologicamente elles parecem-se de modo notavel; ambos são curtos quando novos; as extremidades arredondadas; alongam-se quando envelhecem; têm os mesmos movimentos; tingem-se pelos mesmos reactivos e ambos têm cilios vibrateis.

Cultivados em caldo, gelatina ou gelose têm ambos os mesmos caracteres; sómente os cilios vibrateis são em menor numero no B. coli, não excedendo de 6 a 8; emquanto que no outro podem chegar até 14, e assim mesmo é preciso fazer culturas simultaneas dos dois germens para se tirar d'esta circumstancia algum indicio

Em caldo o coli-bacillo cresce mais depressa e com mais viço do que o outro. Sobre batata a differença é um pouco mais accentuada: o B. coli dá manchas pardacentas, emquanto que o B. typhico desenvolve-se em cultura discreta, apenas apparente; entretanto certas variedades do

B. coli apresentam esse aspecto e então é preciso procurar mais longe outros signaes de distincção. Cultivado no leite o coli-bacillo coagula aquelle liquido ; o bacillo de Eberth, pelo contrario nenhuma alteração lhe causa.

Nos meios assucarados, principalmente com o assucar de leite, o B. coli desenvolve muita acidez, ao contrario do outro. Finalmente o coli-bacillo faz a glycerina fermentar, ao passo que o bacillo de Eberth não produz aquelle phenomeno.

Estas propriedades podem ser demonstradas por meio de um artificio.

Preparam-se meios gelatinados e adoçados com lactose, juntando-se tambem um pouco de tintura de tournesol ; logo que o B. coli desenvolve-se apparecem em roda d'elle manchas vermelhas, devidas aos acidos secretados pelo microbio. Este facto não se observa com o bacillo typhico, que deixa ao tournesol a sua coloração azul, apenas um pouco desbotada.

Fazendo-se uma solução de peptona a 2 % em assucar e juntando-se ao mesmo tempo algumas gôttas de nitrato de potassio a 0,02 % com um pouco de acido sulfurico diluido, no fim de 24 horas tem-se : com o B. coli uma coloração vermelha ; e com o B. typhico nada de anormal. Eis ahi um excellente signal de distincção.

O coli-bacillo em presença do assucar dá acido *lactico direito ;* ao passo que o typhico produz o acido *lactico esquerdo.* E' do conjuncto de todos estes signaes que se deve deduzir o diagnostico, e por isso o bacteriologista deve cercar-se de todas as cautelas afim de evitar um erro de apreciação.

Pelo que vem de ser exposto comprehende-se a difficuldade de isolar o coli-bacillo das aguas. O emprego da formalina em solução a 1 para 5,000 mata o bacillo typhico, emquanto que B. coli póde ahi viver.

Estas similhanças entre os dous germens têm levado alguns authores a attribuir-lhes uma origem commum e a

consideral-os apenas como variedades de uma mesma raça; e manda a verdade que diga-se que esta theoria parece mesmo encontrar apoio nas observações clinicas. E' fóra de duvida que na anzencia de epidemias tem-se visto a febre typhoide apparecer em individuos isolados, vivendo em logares sãos; esses individuos esgotados pela fadiga offerecem pouca resistencia ao bacillo, que está sempre presente na economia. E' o que em clinica chama-se auto-typhisação.

Por outro lado consegue-se, por meio de culturas e artificios de laboratorios, fazer o B. coli apresentar todas as apparencias do bacillo de Eberth e vice-versa. Sómente pode-se objectar que essas experiencias não criam uma raça nova, visto como as qualidades adquiridas não se transmittem hereditariamente.

O argumento mais solido em favor da differenciação é que o B. coli encontra-se por toda a parte e em grande abundancia, e nem por isso a febre typhoide manifesta-se com a mesma frequencia; e todavia é notavel que uma agua contaminada pelo B. typhico nunca deixe de dar uma epidemia da molestia.

Sanarelli chama a attenção para a differença sensivel na maneira de agir das duas toxinas sobre os intestinos: a do B. typhico produz uma descamação muito maior do que a outra.

A questão não foi definitivamente resolvida; mas como quer que seja o colibacillo affecta relações estreitas com a febre typhoide.

Sanarelli tem a seguinte concepção original da molestia: para elle ha a principio uma molestia do intestino; os microbios typhicos entram nas vias lymphaticas e secretam suas toxinas, que envenenando o organismo dão logar aos symptomas da febre typhoide, produzindo a descamação intensa do intestino, de todos conhecida. N'esse momento intervem o *Bacterium coli* causando por sua vez outras lesões, desde que achou na descamação e no liquido diarrheico

as condições favoraveis para proliferar. Mais tarde o organismo reage e então o B. coli é pouco a pouco expellido do intestino.

Objecta-se-lhe que elle colloca-se em condições experimentaes que estão longe do que se passa na pratica, e que ainda assim as suas experiencias não reproduzem os symptomas da febre typhoide; a isto elle replica que no homem a cultura é lenta e se faz pouco a pouco; emquanto que nos animaes ella é rapida, podendo ás vezes haver até a sideração do organismo.

FEBRE RECURRENTE

SUMMARIO— Simptomas principaes.—*Spirochæte Obermeieri*—Caractéres d'este microbio.—Auzencia de culturas.—Coloração.—A molestia nos macacos.—Inoculação no homem.— Etiologia da febre recurrente.—Pathogenia da crise.—Molestia dos gansos

---

A febre recurrente appareceu pela primeira vez na Inglaterra e na Irlanda, onde foi confundida com outras molestias, especialmente com a febre typhoide, da qual se distingue entretanto por sua marcha caracteristica.

Começa por um calefrio violento : a temperatura sobe lentamente a 40 gráos e meio e mantem-se n'essa altura durante alguns dias, com ligeiras remissões matinaes ; depois de uns quatro ou cinco dias a temperatura sobe ainda um pouco mais, para cahir bruscamente no gráo normal, onde se mantem durante outros quatro ou cinco dias. Findos estes vem um novo accesso em tudo similhante ao primeiro : durante este tempo o estado geral do doente é satisfactorio e a molestia termina ordinariamente pela cura. Os accessos podem ser em maior numero.

Ha dôres musculares e hyperemia para o baço ; algumas vezes sobreveem abcessos n'esta viscera, o que constitue

uma complicação em uma molestia geralmente benigna, tanto que só dá dois mortos em cem individuos atacados.

Na França a molestia é quasi desconhecida, ao passo que na Irlanda e nos paizes slavos ella é frequente, bem como na Russia e nos Balkans. Em Pariz desconhecem-na os clinicos da actual geração, pois os unicos casos que modernamente poderam ser observados por poucos medicos da grande metropole, deram-se em uns annamitas e siamezes durante a exposição de 1889.

As primeiras experiencias e observações feitas no sangue dos doentes de *febre recurrente* datam do anno de 1866; notou-se que certos grupos de globulos vermelhos apresentavam uma mobilidade original; via-se atravessarem o campo do microscopio especie de flechas ou filamentos, arrastando os globulos.

Em 1873 Obermeier, chefe do laboratorio do professor Virchow, em Berlim, durante uma epidemia de febre recurrente fez estudos sobre o sangue dos doentes e vio *spirillos* que elle não tinha ainda visto em outras molestias; mais tarde esses corpusculos receberam o nome d'aquelle observador, e hoje sabe-se serem elles a causa da molestia, que é diagnosticada com segurança sompre que o *spirochate obermeieri* é encontrado no sangue.

Diversos methodos de coloração têm sido propostos para evidenciar-se o spirillo de Obermeier; o preferido geralmente é o de Nikiforoff, que consiste em mergulhar os córtes durante 24 ou 48 horas, a frio, na seguinte solução:

Solução concentrada de azul de methlene..........	10 volumes
Tropeolina a 1 %....	1 volume
Agua distillada..................................	10 volumes

Convem notar que os orgãos devem ser conservados de um modo especial: é preciso que elles tenham sido endurecidos em bichromato de potassio a 5 %, addicionado de um volume igual de sublimado a 1 ‰. Depois de uma demora de 24 horas n'essa mistura o orgão é lavado em diversos banhos de alcool cada vez mais puro, fazendo-se

depois d'isso a inclusão. Este methodo excellente para o *spirillo*, tombem o é para muitos outros microbios delicados.

O microbio da febre recurrente não dá culturas; mas póde conservar-se vivo no sangue durante algumas horas.

Querendo-se observar a sua evolução é preciso que o sangue seja proveniente de uma pessôa viva. O microbio tem sido encontrado no tubo digestivo das sanguesugas, que levam mezes para o digerir.

Na India oriental, onde a molestia é frequente, tentou-se inocular o germen em macacos, conseguindo-se uma febre recurrente experimental, que differe da do homem, porque só dá um accesso, o qual não é seguido de recahida. No fim de 3 ou 4 dias de incubação, o animal torna-se triste e de repente é accommettido de um accesso febril que dura quatro dias; a temperatura mantem-se elevada, voltando depois ao estado normal.

E' sabido que os corpos extranhos—microbios ou outros—não se mantêm no sangue: vão para o baço ou para o parenchyma dos orgãos.

Nos primeiros dias os *spirillos* são vistos ao lado dos globos brancos, que paralysados de alguma sorte, são incapazes de os digerir: esse periodo de inactividade dos leucocytas corresponde ao começo da molestia. Dias depois os microbios desapparecem quasi completamente. Quando a temperatura torna a elevar-se para vir a crise final não se encontram mais os microbios.

Autopsiando-se o macaco vê-se que o *spirillo* não existe mais no sangue, e sim no baço, que tem passado por alterações particulares. Os microbios localisam-se em focos esbranquiçados simulando os corpos de Malpighi; esses fócos têm sido com muita impropriedade denominados «lymphomas»; de facto elles não são formados por cellulas lymphoides; mas são positivamente constituidos pelo accumulo de leucocytas; estes contêm então os *spirillos*, que inoculados reproduzem a molestia.

Em curto espaço de tempo os microbios desapparecem

no interior do protoplasma das cellulas brancas, que examinadas no começo d'essa reabsorpção permittem ainda a coloração dos germens ; o phenomeno vai tornando-se cada vez mais difficil, até que não é mais possivel evidenciar-se o microbio. (Metchnikoff.)

No homem as cousas passam-se do mesmo modo, explicando-se a recurrencia dos accessos pelas novas gerações do micro-organismo. O baço é mesmo o orgão de defeza da economia, e em cujo tecido os microbios emmaranham-se e desapparecem ; fazendo-se a ablação da viscera em um macaco, quando o animal restabelece-se completamente da operação, si o inocularmos com um pouco de sangue carregado do germen, vê-se que o macaco vai dia a dia sendo invadido pelos *spirillos*, que, não sendo mais detidos pelo baço, pullulam extraordinariamente, dando uma molestia mortal.

Pelas inoculações feitas no homem sabe-se que a febre recurrente é o typo das molestias contagiosas. O contagio natural faz-se nos albergues nocturnos á maior parte das vezes ; e são seus agentes as pulgas e os persevejos : esses repellentes insectos picam um doente da molestia e depois dirigindo-se á um homem sadio inoculam verdadeiramente o *spirillo* como no contagio experimental, que nunca falha de homem a homem.

A febre recurrente foi por muito tempo encarada como um typho de fadiga e de miseria, porque era nos meios miseraveis e immundos que reinava a molestia de preferencia ; mas é justamente n'essas condições que os percevejos medram.

Na Russia observou-se uma molestia muito similhante á febre recurrente, na qual não encontraram-se microbios.

O Sr. Sachatoff estudando o paludismo nas aves concluio que ellas o experimentam do mesmo modo que o homem. No curso de suas experiencias elle encontrou nos

gansos espirillos muito analogos aos de Obermeieri aos quaes denominou *spirillum anserinæ ;* sómente no ganso a molestia em vez de benigna, é muito grave; a temperatura normal d'aquella ave é de 42° ; com a molestia attinge a 45° ; mas a queda faz-se tambem por crise.

PALUDISMO

SUMMARIO— As manifestações malaricas são devidas a um parasita.—Trabalhos anteriores á descoberta do *hematozoario*.—em 1878 —Pleomorphismo do parasita.— Diversos aspectos do microbio.—Sua evolução.— Inoculações.— Procura do germen.— Coloração.— Hematozoario dos animaes.

———

Datam de 1866 os primeiros estudos sobre a origem parasitaria do puladismo.

N'aquelle anno Salisbury, medico americano, emprehendeu uma serie de estudos e annunciou que o agente das manifestações palustres era um ser vegetal do genero *palmella*, que elle encontrara no ar dos pantanos do Mississipi.

Mais tarde, Klebs na Allemanha e Tommasi Crudeli em 1879, na Italia, descreveram um microbio a que chamaram *bacillus malariæ*, que elles isolaram do solo, do ar e das lamas do *Agro romano*, terra classica da malaria na Italia, e que, segundo aquelles authores, inoculado em animaes, communicava-lhes a febre intermittente.

No anno de 1878, Laveran, o conhecido medico do exercito francez, author de tantos trabalhos notaveis, encetou uma serie de estudos na Argeria, os quaes deram em

resultado a descoberta de um esporozoario no sangue dos individuos atacados de febre intermittente, ou de outras formas da malaria.

Esta descoberta foi geralmente impugnada e com grande animosidade. O author, firmemente convencido do seu achado, não cedia uma linha e respondia ás criticas apresentando novos factos comprobatorios dos seus primeiros estudos, publicados nos annos de 89, 90 e 91 em revistas e finalmente no tratado volumoso que tem por titulo *Du Paludisme et son hématozoaire.*

Desarmados diante da evidencia dos factos cessaram os ataques e hoje todos os bacteriologistas reconhecem o hematozoario de Laveran como o agente pathogenico do paludismo.

O *laverania hematobia*, como hoje tambem é conhecido aquelle parasita pertencente á classe dos *esporozoarios* é um organismo pleomorpho que se apresenta, segundo a descripção do author confirmada por outros, sob as quatro formas seguintes :

1· *Corpos esphericos*, forma que observa-se com mais frequencia : Laveran encontrou-a só 266 vezes em 420 exames ; e associada a outras 123. Esses elementos que medem de 1 a 6 millesimos de millimetros são animados de movimentos amiboides ; d'ahi tambem o nome que tambem lhes dão de *corpos amiboides*. Elles são compostos de uma substancia hyalina, transluscida e apresentam-se sob o aspecto de pequenas manchas claras colladas aos globos vermelhos, ou isolados no soro ; cada hematia póde conter mais de um d'esses corpusculos claros ; por sua vez estes contêm um ou mais pontos de pigmento negro, pontos que augmentam em numero á medida que o parasita cresce.

2· *Flagella* : dos bordos dos corpos esphericos partem ás vezes *flagella* ou filamentos, que se agitam com rapidez e transmittem aos globulos visinhos movimentos diversos. Esses filamentos são muito maiores do que as hema-

tias, mas são tão delgados e é tal a sua transparencia, que não é possivel distinguil-os, quando em reposo. Cada corpo espherico póde apresentar de 1 a 4 *flagella* agrupados symetricamente, ou não. Algumas vezes destaca-se um *flagellum*, que passa a fluctuar livremente no serum. Na opinião de Golgi—o grande histologista italiano, os corpos flagellados são frequentes na forma quartã; ao passo que são raros na forma terçã da febre intermittente.

3·— *Corpo em crescente*: esta forma é sobretudo encontrada no sangue dos individuos longamente impaludados, nos cacheticos. São igualmente translucidos, contendo um grupo de manchas de pigmento accumuladas no centro do crescente; este fluctua no serum, ou solda-se aos globos vermelhos.

4·— *Rosacea ou margarida* é uma forma que tambem affecta o hematozoario de Laveran; pensam muitos bacteriologistas que esta forma é o unico modo de reproducção do parasita. Rara nos estados chronicos, encontra-se a *rosacea* com mais frequencia nos primeiros accessos de febre; mas nem sempre as *margaridas* são encontradas no sangue e somente no baço ou no figado.

Certos corpos esphericos começam a apresentar nos bordos uma especie de dentes; é o primeiro gráo da segmentação. Em seguida as reintrancias tornam-se mais profundas e está formada a rosacea. Por fim destacam-se os fragmentos, fornecendo pequenas espheras livres não contendo pigmento, porque este só apparece nas formas adultas. As margaridas podem apresentar um numero variavel de segmentos, acompanhando cada forma com mais ou menos frequencia tal ou tal forma da febre intermittente, na opinião de alguns authores italianos, como Golgi, Canalis, Grasse, Feletti e outros. Leveran, porem, não partilha d'este modo de ver, affirmando que são phases da evolução e nunca variedades do mesmoparasita.

Nunca se conseguio cultivar artificialmente o esporozoario de Laveran. Elle tem sido inoculado de homem a

homem por experimentadores italianos (Marchiafava, Mariotti, Celli e Ciarocchi) e pelo proprio Laveran, que aconselha a injecção intravenosa do sangue de um paludico; no fim de oito dias apparece o parasita no sangue e manifestam-se os primeiros symptomas do paludismo agudo.

É no começo dos accessos, ou um pouco antes, que deve ser procurado o parasita no sangue dos doentes. Nos cacheticos elle é visto naquelle liquido, no intervallo dos accessos; entretanto na apyrexia, ou quando o doente tem sido medicado com os saes de quinina, a regra é não se encontrar o hematozoario no sangue da peripheria.

Depois de lavar a mão com sabão pica-se a polpa do dêdo com um alfinete e recolhe-se a gotta de sangue em uma amina, que será immediatamente coberta por uma laminula bem limpa; é bom fazer uma ligeira pressão sobre esta para que o sangue espalhe-se em camada delgada sobre o porta-objecto. Levando-se ao microscopio divulga-se bem tudo quanto ficou descripto mais atraz, relativamente a morphologia do parasita, independente de qualquer processo de coloração.

Querendo-se, porém, coloril-o ha diversos processos dando bom resultado, como sejam o azul de methylene, o violeta de genciana, o violeta de dhalia e a hematoxilina de Bœhmer. Entretanto o exame das preparações a fresco é muito mais util e instructivo do que quando ellas são coloridas.

Muitos animaes, especialmente os pombos e as aves em geral, apresentam no sangue hamatozoarios muito similhantes ao do paludismo, cuja identidade com aquelles é affirmada por muitos observadores. Laveran, porém, nega o facto baseado em estudos aprofundados que sobre o assumpto tem feito, allegando differenças entre os dois parasitas, tanto morphologicas como biologicas. Esta maneira de ver tambem é a de muitos outros bacteriologistas.

CHOLERA E VIBRIÃO (*)

SUMMARIO — Investigações de Koch.—Bacillo virgula no intestino.— Coloração.— Valor dignostico do vibrião.—Isolamento. Raças do microbio.—Culturas.— Reacção indol-nitrosa. — O bacillo no homem e nos animaes.—Formas de involução.—Peritonite cholerica. — Phenomeno de Pfeiffer.— Esporos.— Cilios.— Espirillos.— Vaccinação contra o cholera.— Toxinas cholericas.— Hypothese sobre a epidemiologia do cholera.

A microbia do cholera é certamente um dos capitulos mais complicados e mais difficeis de toda a historia natural dos germens pathogenicos.

Durante muito tempo a sciencia contentou-se em observar os phenomenos que se passam no homem doente, ou morto de cholera, sem poder recorrer á experimentação sobre animaes, aliás indispensavel á solução de tantos problemas importantes.

(*) O estudo do assumpto d'este capitulo pertence ao professor Metchnikoff, e a sua redacção actual reproduz textualmente a forma que lhe deu o prelector. quando fez a sua magistral lição no curso de bacteriologia do «Instituto Pasteur». em 1895-96.

O começo de nossos conhecimentos sobre a microbia do cholera asiatico data da memoravel expedição de Koch e alguns de seus discipulos em 1883. A commissão dirigiu-se primeiramente ao Egypto, onde em breve faltaram os materiaes de estudo, pela terminação da epidemia que então reinara alli. Koch e seus auxiliares seguiram para o Hindostão e lá conseguio elle, graças á applicação de seus methodos que depois ficaram classicos, descobrir o microbio do cholera. O exame minucioso das dejecções, do conteúdo intestinal e dos cortes histologicos do intestino de cholericos mostraram a presença constante de uma bacteria particular, que elle designou pelo nome de *bacillo virgula*.

Mais tarde verificou-se que este microbio era mais um vibrião ou um espirillo do que mesmo um bacillo ; entretanto tem-se conservado o nome escolhido por Koch ; e em linguagem corrente de bacteriologia tanto faz dizer-se *bacillo virgula*, como *vibrião cholerico*, visto as duas expressões significarem a mesma cousa. Por sua forma encurvada o vibrião cholerico apresenta a maior similhança com os vibriões que encontram-se em grande quantidade e constantemente na cavidade buccal do homem sadio ; mas ao passo que os vibriões dentarios não se desenvolvem em nenhum dos meios de cultura empregados nos laboratorios, o vibrião cholerico prolifera em qualquer meio. Elle dá uma cultura das mais caracteristicas em gelatina, onde produz pequenas colonias de bordos irregulares sobre toda a superficie da massa. No começo as colonias não liquefazem a gelatina ; mas chegadas a um certo gráo de desenvolvimento ellas cercam-se de uma zona clara de gelatina liquefeita ; é então que apparecem no liquido pequenos funis, cuja grande abertura acha-se voltada para a superficie ; emquanto que a parte opposta, encerrando os vibriões, penetra nas camadas mais profundas. A' medida que as colonias crescem, destacam-se da massa central pequenos

grumos que espalham se pelo calix ou funil formado pela gelatina.

Semeando-se o conteúdo intestinal ou particulas das dejecções humanas sobre placas de gelatina, encontram-se estas colonias que acabamos de descrever ; examinadas ao microscopio nota-se que ellas são compostas de vibriões muito moveis. Quando Koch fez a sua notavel descoberta declarou que o bacillo virgula acha-se constantemente nos casos de cholera verdadeiro, e que no homem são e nos doentes de outras molestias não é elle encontrado.

A epidemia de Toulon em 1884 forneceu a Koch e a diversos bacteriologistas francezes uma opportunidade de verificarem a descoberta do bacillo virgula, que de facto foi encontrado na immensa maioria dos casos observados. Depois, em varios pontos do globo, confirmou-se o mesmo facto ; e quando não se podia encontrar o microbio, acreditava-se na intervenção de qualquer causa accidental embaraçando a demonstração, como fossem, por exemplo, um exame tardio, ou uma technica imperfeita. Tambem quando em 1893 esta foi aperfeiçoada com a introducção da agua peptonisada, addicionada de 2% de gelatina, os casos de cholera sem vibrião tornaram-se cada vez mais raros.

Este aperfeiçoamento tão util ao estudo do cholera trouxe uma complicação muito grave : graças ao emprego de um meio de cultura tão favoravel aos vibriões, descobriu-se uma serie de microbios analogos, o que torna em certos casos difficilimo o diagnostico do bacillo virgula. Já anteriormente conheciam-se vibriões muito parecidos com o do cholera asiatico, como o de Finkler e Prior *(vibrio proteus)*, o de Deneke, e especialmente o de Gamaleia *(vibrio metchnikowi)* ; mas essa analogia não trazia grandes difficuldades para o diagnostico differencial porque dos tres, o de Finkler e Prior era o unico que encontrava-se no homem são, ou nos casos de cholera-nostras ; mas dintinguia-se do bacillo virgula pela liquefacção muito mais intensa da gelatina, pelas colonias de contornos arredondados e

mais outros caractères. O vibrião de Deneke só tinha sido encontrado no queijo, e o de Gamaleia, o mais parecido com o do cholera, era exclusivo de uma epizootia das aves.

A difficuldade de reconhecer o vibrião do cholera tornou-se, porém, enorme quando houve necessidade de demonstrar-se a sua presença nas aguas: A applicação da agua peptonisada no exame das aguas de varias procedencias levou a descobrir-se o bacillo em um grande numero de casos, onde não se podia de maneira alguma suspeitar da existencia de germens cholericos. Este facto despertou a attenção dos bacteriologistas, que começaram a não ter mais confiança na distincção entre aquelles vibriões e o do cholera.

Depois de muita hesitação e de debates prolongados chegou-se á conclusão de que o vibrião do cholera é um microbio que varia notavelmente em seus caractéres. A principio suppunha-se que as dimensões, a mobilidade e a liquefacção da gelatina eram signaes constantes que caracterisavam o bacillo virgula; mas teve-se logo de renunciar a essa segurança de diagnostico, porque esses caracteréres mudavam, segundo uma multidão de circumstancias. O bacillo virgula movel póde ser transformado em uma raça immovel; assim como as formas grossas do vibrião podem se tornar tenuissimas e constantes, por transmissão hereditaria.

Em presença d'esses factos os bacteriologistas ficaram perplexos, e maior foi a duvida quando em 1892 reappareceu o cholera na Europa, sem que se podesse explicar essa brusca invasão. Recomeçaram com ardor as investigações, mas ao passo que anteriormente só encontrava-se o bacillo em casos de cholera confirmado, na occasião a que nos referimos foi elle encontrado nas dejecções de individuos sãos (Rumpel), e nas aguas de fontes muito diversas (Frœnkel, Lubarsch, Blachstein, Sanarelli, etc.). Este

ultimo descobrio o microbio no intestino de animaes de laboratorio.

Afim de evitar confusão, que não tardou a apparecer com similhante estado de cousas, Koch propoz em 1893 modificar o diagnostico do vibrião cholerico. Ao lado dos caracteres morphologicos, cuja instabilidade não offerecia muitas garantias, elle indicava certas propriedades funccionaes. Sabia se desde alguns annos que as culturas do bacillo virgula davam com certos acidos uma coloração rosea (Pœhl, Bujwid, Durham). Segundo as pesquizas de Salkowsky esta reacção é devida á reducção dos nitritos contidos nos meios de cultura em nitratos pelos vibriões, em presença do *indol* perfumado. A importancia da reacção rosea ou indol-nitrosa diminue quando tem logar em culturas sobre caldo ou gelatina, e só póde ser bem apreciada recorrendo-se á agua peptonisada: n'estas condições a reacção rosea faz-se com tal constancia que Koch a recommendou como essencial ao diagnostico. Um segundo caracter funccional tido como elemento indispensavel de diagnostico pelo celebre bacteriologista era a virulencia do microbio para o cobayo, pois desde a descoberta do bacillo tem sido elle inoculado em animaes, e o proprio Koch conseguio matar cobayos pela ingestão; mas isso em condicções muito artificiaes, como a ligadura do canal coledoco, introducção de alcalis no estomago, envenenamento com alcool e opio, para que se podesse tirar conclusões.

Estavam as cousas n'este pé quando foi recebida com verdadeira alegria a noticia da descoberta de Hueppe e R. Pfeiffer, que injectando o vibrião cholerico no peritoneo dos cobayos determinaram n'esses animaesinhos uma molestia aguda, acompanhada de hypothermia consideravel e matando na grande maioria dos casos. Posto que esta molestia apresente poucas analogias com o verdadeiro cholera intestinal, todavia serveria de indice da virulencia do bacillo e conseguintemente de signal diagnostico do mesmo. Em maio de 1893 Koch estabelecia os seguintes conceitos.

« O verdadeiro microbio especifico do cholera distingue-se por sua forma curva e crescimento typico sobre placas de gelatina.

« O bacillo deve dar a reacção indol-nitrosa : injectado na dose de um milligramma e meio de cultura fresca sobre agar elle deve produzir uma peritonite mortal nos cabayos pesando de 300 a 350 grammas».

Armados d'esta nova formula os bacteriologistas poseram-se á procura do vibrião do cholera em todas as condições. As contradicções tornaram-se tão frequentes que mesmo no Instituo de Koch, em Berlim, abandonou-se a nova doutrina.

Muito antes da publicação mencionada sabia-se bem que a reacção rosea era commum tanto ao bacillo virgula como ao vibrião de Gamaleia, que entretanto nenhuma relação tem com o cholera humano. Quanto á virulencia, a instabilidade d'esse caracter é tão grande que ninguem se animava a consideral-o typico para o diagnostico do bacillo ; mesmo porque experiencias irrecusaveis vieram posteriormente provar a sua falibilidade nos cobayos. A conclusão que se impunha diante d'estes factos era que muitas vezes é impossivel estabelecer uma distincção nitida entre o vibrião cholerico e seus congeneres.

Como certas medidas praticadas contra a expansão do cholera eram precisamente baseadas no diagnostico exacto dos primeiros casos da molestia, assim como na presença do bacillo virgula nas aguas, gravissimos eram os inconvenientes que decorriam d'aquella incerteza de opiniões.

Muitos sabios tendo, por outro lado, descoberto vibriões que liquefazem a gelatina de modo typico, dando a reacção rosea e accusando virulencia no peritoneo do cobayo, recusaram pronunciar-se sobre a natureza cholerica ou não, das bacterias questionadas (Dunbar).

Não obstante continuavam os estudos serios para encontrar-se um caracter constante que servisse de criterio ao diagnostico do bacillo. Aprofundou-se o conheci-

mento das propriedades chimicas dos vibriões ; estudou-se o acido lactico que esses germens fabricam com a lactose e chegou-se á conclusão de que os vibriões os mais diversos por sua morphologia, o de Gamaleia, o de Finkler e Prior e outros dão todos elles, como o do cholera, em todas as condições estudadas o acido lactico desviando o plano de polarisação á esquerda (Kauprianow). Tambem verificou-se ser a mesma para todos aquelles microbios a energia de decomposição do assucar, traduzindo-se pela producção de acido.

Todavia si na ordem chimica as investigações não davam resultados animadores, restava o campo biologico para onde voltaram-se todos ; e logo pensou-se que o estudo das propriedades vaccinantes poderia dar resultados mais precisos.

Ficou estabelecido por Vinzenzi e outros que as injecções de quantidades não mortaes do bacillo virgula—vivo ou morto — preservavam os cobayos contra a peritonite cholerica ; a vaccinação d'esses roedores tinha-se tornado cousa facilima ; mas logo que tentou-se applicar esses resultados para caracterisar o bacillo, teve-se que recuar.

Klein, de Londres, foi o primeiro a mostrar que para vaccinar-se animaes não havia necessidade do vibrião cholerico : injecções de diversas outras bacterias bastam para garantir a immunidade dos cobayos contra a peritonite provocada pelo bacillo virgula. Esta descoberta foi logo confirmada e, o que é mais interessante, foi estendida a outras substancias de origem não microbiana. Issaeff, em um trabalho feito no laboratorio de Pfeiffer, no Instituto de Koch, verificou este facto importante : que as injecções previas de caldo nutritivo ordinario, ou mesmo da solução physiologica de chlorureto de sodio, preservam muito bem os cobayos. A ideia de uma acção vaccinante especifica parecia, pois, excluida de modo definitivo. Entretanto Pfeiffer e Issaeff chegaram a resultados inteiramente contrarios a esse modo de ver : segundo esses authores a in-

fluencia preservadora de differentes liquidos não microbianos, ou de productos provenientes de bacterias outras que não o bacillo virgula é ephemera ; só dura alguns dias.

Querendo-se immunisar os cobayos por um periodo de semanas ou de mezes é indispensavel injectar-lhes productos microbianos ; isto é : productos do microbio contra o qual é dirigida a vaccina. A acção especifica de uma bacteria se manifestaria n'este caso, não por uma virulencia mais ou menos fixa, mas sim por uma propriedade vaccinante prolongada e duravel. Este modo de ver permitte aos citados authores affirmarem que todo vibrião suspeito é o bacillo virgula, si esse vibrião fôr capaz de preservar os cobayos por muitas semanas, contra um vibrião notoriamente cholerico ; isto é : proveniente de um caso authentico de cholera asiatico reinando epidemicamente.

Wesbrook confirma por experiencias estas conclusões, que foram por outro lado contrariadas por Max Gruber, bacteriologista muito habil. Depois de ter vaccinado muito bem uma serie de cobayos com bacterias de varias procedencias *(bacillus coli, vibrio danubicus, vibrio massaouah, vibrio versailhis)* Gluber experimentou, vinte dias depois da ultima injecção vaccinal, um vibrião cholerico verdadeiro ; todos os animaes resistiram bem á dose mortal do virus cholerico, que matou os animaes testemunhas. Bonhoff obteve tambem resultados analogos, porém menos constantes.

O periodo de tempo indicado por Pfeiffer e Issaeff como limite da acção especifica vaccinante não póde, pois, ser acceito. Deve-se admittir que um microbio dado vaccine melhor contra sua propria acção pathogenica do que qualquer outra, mas não se deve ir além d'essa noção geral ; querer, porém, tirar d'ella conclusões para o diagnostico no terreno da pratica, é com certeza pouco scientifico.

Os mesmos authores proposeram ainda uma modificação do seu methodo : segundo elles o serum dos animaes vaccinados apresenta uma acção incontestavel e por conse-

quencia póde servir para fixar o diagnostico. Dunbar confirma estes resultados; mas Sanarelli, entre outros, achou que o serum dos cobayos vaccinados contra o vibrião de Gamaleia e o serum dos coêlhos vaccinados contra o bacillo typhico, preservavam cobayos novos contra doses mortaes do virus cholerico authentico.

Estes resultados concordam mais com a regra estabelecida pelo Dr. Roux sobre a acção dos sôros—-que, diz elle, que apezar da acção especifica de alguns d'elles, existe um grande numero de casos em que o serum dos animaes vaccinados contra uma determinada molestia preserva tambem outros animaes contra uma molestia differente. E' assim que o serum antitetanico, impotente contra a diphteria, é efficaz contra o veneno das cobras. Um outro exemplo é fornecido pelo serum dos animaes que têm recebido grandes dóses do virus rabico: este serum, impotente contra a raiva, vaccina muito bem contra o veneno ophidico, como tem sido verificado tantas por Calmette.

Nas suas objecções contra a regra formulada pelo Dr. Roux assignala Pfeiffer um engano que elle suppõe ter sido commettido por aquelle eminente exprimentador. Segundo o professor Roux o serum dos animaes vaccinados contra a diphteria torna os *coêlhos* mais resistentes á acção da *abrina*—o principio toxico contido no *jequerity*, que sob tantos pontos de vista approxima-se dos venenos microbianos. Pfeiffer negando o facto apoia se em experiencias ineditas de Ehlich; ora, este ultimo observador mostrou o seu caderno de experiencias ao professor Metchnikoff, onde este verificou que as experiencias tinham sido feitas sobre *cobayos* e não sobre *coêlhos*, animaes sobre os quaes operou o Dr. Roux. Não ha portanto contradicção alguma entre os resultados obtidos pelos dois notaveis experimentadores.

Proseguindo em seus estudos sobre a acção especifica dos soros R. Pfeiffer descobriu um phenomeno que lhe serve de base para o diagnostico seguro do vibrião cholerico: referimo-nos ao curioso phenomeno da destruição

dos vibriões na cavidade peritoneal dos cobayos. O «phenomeno de Pfeiffer» como propõe o professor Metchnikoff que se denomine, consiste no seguinte: injectando-se no peritoneo de um cobayo uma dose mortal de vibriões pathogenicos misturada com uma dose immunisante de serum de um animal bem vaccinado contra o mesmo microbio, os vibriões ficam desde de logo immoveis e transformam-se depois de um tempo muito curto (30 minutos) em pequenos corpos esphericos similhantes a *coccos*. Esta transformação, que se opera fóra dos leucocytas, termina pela morte e pelo desapparecimento completo dos vibriões.

Si tomarmos uma mistura de duas especies microbianas—a do vibrião cholerico e outra de um vibrião analogo, conhecido por vibrião de Nordhafen— e si introduzirmos essa mistura no peritoneo do cobayo com um pouco de serum de um animal vaccinado contra o primeiro, é este sómente que soffre a transformação em espheras; emquanto que o de Nordhafen conserva-se vivo e acabará matando o animal. Si, porém, a mistura injectada fôr feita com serum de animal vaccinado contra o vibrião de Nordhafen, este ultimo é que experimentará o phenomeno de Pfeiffer, ficando o outro indemne.

Muitos vibriões provenientes de casos de cholera epidemico reinando na Allemanha, França, India, Turquia, etc. dão nas condições indicadas o phenomeno da destruição extra-cellular. Certos vibriões das aguas dão igualmente o phenomeno de Pfeiffer com o serum anti-cholerico; mas esses vibriões são raros e só se encontram no curso de epidemias cholericas. Outros vibriões das aguas, que desenvolvem-se em gelatina, como o bacillo virgula e que como dão a reacção rosea, não apresentam o phenomeno de Pfeiffer. Estes vibriões devem ser considerados como habitantes vulgares e pacificos das aguas e incapazes de provocar um cholera epidemico; mas tambem é certo que podem produzir uma molestia choleriforme no homem, como tem-se o exemplo nos casos observados em 1893. em

Hamburgo e em 1894, em Lisbôa. Alguns d'estes vibriões distinguem-se ainda pela phosphorescencia e por certas anomalias de crescimento sobre a gelatina.

E' pois incontestavel que o phenomeno de Pfeiffer deve occupar um logar entre as reacções do vibrião cholerico e deve ser utilisado como elemento de diagnostico d'aquelle microbio; entretanto é necessario fazer-se um estudo mais aprofundado sobre o assumpto antes de classificar-se um tal phenomeno definitivamente entre os signaes certos do bacillo virgula. De facto, como resolver-se sobre a especificidade de um microbio sem que elle possa provocar epidemia? «A não ser o bacillo virgula nenhum dos vibriões pathogenicos produzindo o phenomeno da transformação, provoca epidemia grave»—tal é a ultima affirmativa de Pfeiffer.

Esta proposição é absoluta e não está provada. Entre os vibriões cholericos cabe um grande papel ao de *Massaouah — Ghinda*, isolado por Pasquale na Africa italiana e introduzido em varios laboratorios da Europa. Foi com este vibrião que o proprio Pfeiffer obteve os preciosos resultados sobre a peritonite cholerica dos cobayos; pois bem: o serum dos animaes vaccinados contra o cholera de origem allemã mostrou-se incapaz de vaccinar cobayos contra o vibrião de Massaouah; além d'isso esse mesmo serum nunca provocou o phenomeno de Pfeiffer com o vibrião respectivo.

Allega Pfeiffer que o vibrião de Pasquale não é o do cholera e deve ser excluido da classe dos cholerigenos; entretanto em uma experiencia feita sobre o homem por Fermi, em Roma, o vibrião de Ghinda mostrou-se muito virulento provocando um ataque não mortal, mas absolutamente typico, do verdadeiro cholera.

Referindo-se a essa experiencia de Fermi, em uma memoria recente, Pfeiffer, que por engano a attribue ao professor Metchnikoff, replica que um caso isolado de cholera experimental não póde decidir a questão: seria pre-

ciso que tivesse havido um desenvolvimento epidemico. Mas Pasquale insiste justamente sobre o facto de ter sido o seu vibrião encontrado em dois poços de Ghinda, localidade em que a epidemia fez mais victimas, e accrescenta que 20 dias depois de extincta a epidemia, diversas pessôas que beberam aquella agua tiveram casos mortaes de cholera.

De outro lado ha vibriões que dão muito bem o phenomeno da destruição extra-cellular, mas nunca provocam epidemias. Depois da epidemia de 1892, em Pariz e suas circumvisinhanças não houve mais um só caso de cholera: mas durante o verão de 1893 appareceram em Saint Dénis uns casos suspeitos esporadicos, em dos quaes o Dr. Netter encontrou o vibrião typico; não houve epidemia. No anno seguinte (1894) ainda em Saint Dénis, de um caso benigno suspeito, o mesmo Dr. Netter isolou o vibrião que não deu igualmente origem a nenhuma epidemia.

Eis ahi casos isolados sobrevindo no espaço de dois annos sem tomar desenvolvimento epidemico, isso na auzencia de qualquer medida prophylactica ou de hygiene. E este vibrião que não foi capaz de produzir uma expansão epidemica, nas experiencias a que foi submettido deu o phenomeno de Pfeiffer em sua forma mais bella e completa; isso quer dizer, portanto, que apezar do alto interesse da descoberta do bacteriologista berlinez, não tem ella o poder para caracterisar de modo indiscutivel o vibrião cholerico.

O *bacillo virgula* não toma o *gram*, mas deixa-se colorir por todas as côres basicas. Uma solução de fuchsina phenicada de Ziehl, diluida em 10 ou 20 partes d'agua, em contacto com as laminas durante alguns minutos, é um bom processo para evidenciar-se o microbio. Este tem cilios vibrateis reunidos algumas vezes em uma só das extremidades; outras vezes os cilios revestem o aspecto de um chicote de duas pernas. O germen não da espóros e póde ainda affectar a forma spirillar.

A incerteza d'esses caracteres especificos do bacillo virgula tem sido explorada pelos adversarios da bacteriologia como uma prova do pouco valor d'esta sciencia, sob o ponto de vista medico. Na variabilidade do vibrião cholerico quiz-se ver um argumento contra o papel etiologico d'esse microbio no cholera.

Cuningham, baseando-se sobre a diversidade das formas microbianas ,emittio a seguinte opinião : «o cholera asiatico é sempre uma e a mesma molestia ; os vibriões que se encontram nos cholericos são differentes, logo essa molestia unica não póde ser produzida por causas etiologicos diversas : por conseguinte o vibrião de Koch não é o productor do cholera»

Casos de cholera em que os bacillos não eram encontrados ; exemplos de individuos de bôa saúde, cujas dejecções encerravam esses microbios ; a differença entre o cholera experimental nos animaes e o cholera intestinal no homem e muitos outros factos têm sido invocados como provas de que o bacillo virgula não é o verdadeiro microbio do cholera.

Com o fim de resolver esse problema de modo preciso Pettenkofer decidiu-se a absorver uma grande quantidade de vibriões cholericos em condições particularmente favoraveis para a acção pathogenica d'esses germens. Depois de ter bebido uma dóse sufficiente de um alcalino para neutralisar a acidez do succo gastrico, o ousado professor de Munich engolio um centimetro cubico de cultura do bacillo virgula, proveniente de dejecções cholericas da grande epidemia de Hamburgo. Apezar da grande idade do celebre epidemiologista e das condicções em que elle submetteu-se á experiencia, o resultado d'esta foi antes negativo : a enorme quantidade de vibriões ingeridos provocou apenas uma ligeira diarrhéa não acompanhada de qualquer outro symptoma. Encorajado pelo exemplo de seu mestre, Emmerich submetteu-se á uma experiencia analoga, absorvendo uma quantidade menor de vibriões, mas em condições muito graves : não sómente elle auxiliou a acção do bacillo

pela neutralisação previa do succo gastrico, como tambem provocou uma indigestão, commettendo um desvio de regimen. Apezar de todas essas precauções elle teve apenas uma diarrhéa violenta, sem vomitos, sem caimbras e sem hypothermia.

D'essas experiencias concluio Pettenkofer que o vibrião de Koch era capaz de dar a diarrhéa, mas não o verdadeiro cholera; que para a producção d'este era preciso ainda a intervenção de uma outra causa que não se conhecia até aquelle momento. Outros sabios, pelo contrario, affirmaram que a diarrhéa dos dois audaciosos experimentadores tinha sido uma forma ligeira do cholera, como é costume observar-se no correr das epidemias.

Esta controversia provocou novas experiencias em Vienna e em Pariz. No «Instituto Pasteur» o professor Metchnikoff e mais dez ou doze pessôas realmente corajosas e desinteressadas submetteram-se á experiencia, absorvendo culturas do bacillo virgula authentico. Uns nada tiveram; outros apresentaram diarrhéa riziforme, vomitos, caimbras algidez e outros symptomas, de modo a não deixar duvidas, fallecendo mesmo um d'esses doentes.

D'estas experiencias tirou-se a prova definitiva de que o vibrião de Koch ingerido só, sem nenhum outro microbio e fóra de uma epidemia póde provocar no homem o cholera asiatico verdadeiro. Mas tambem tanto estas experiencias de Pariz como as Vienna demonstraram de modo preciso que o homem póde impunentemente ingerir grandes quantidades do bacillo virgula sem apresentar a menor perturbação, ou pelo menos só ter uma diarrhéa insignificante. O acaso quiz mesmo que nos dois casos graves mencionados acima o cholera experimental fosse provocados por vibriões quasi sem virulencia para os animaes: ao passo que nos outros casos,—n'aquelles em que quasi nada observou-se de anormal, os vibriões empregados tinham a virulencia normal, tanto assim que davam a peritonite dos cobayos. Do conjuncto d'estes factos impõe-se uma con-

clusão : —é que o vibrião de Koch é o verdadeiro agente etiologico do cholera asiatico.

Entretanto como muita gente apresenta grande insensibilidade ou resistencia a este microbio, forçoso é admittir a existencia de condições particulares que favoreçam a sua acção pathogenica. Nota-se já desde algum tempo que entre as cousas predisponentes do cholera estão, ao lado do alcoolismo, as perturbações digestivas de toda a sorte, principalmente os catharros intestinaes. Ora, cada vez torna-se mais provavel que esses desarranjos gastro-intestinaes sejam, como tantas outras molestias, devidos a microbios ; não é, portanto, sem fundamento suppôr-se que esses micro-organismos representem um papel no desenvolvimento do cholera.

Muito antes da descoberta de Koch já Nœgeli expunha a sua *theoria diblastica* do cholera, segundo a qual a molestia resultaria da acção concommittante de dois microbios differentes, sendo um de origem indiana e outro da localidade invadida pela epidemia. Esta theoria foi muitas vezes sustentada por authores da escola epidemiologica de Munich. Recentemente Nencki e seus discipulos querendo fornecer provas experimentaes em apoio da associação microbiana injectaram em coêlhos misturas microbianas, compostas do bacillo virgula e de tres outros bacillos isolados das dejecções cholericas e designados por elles sob o nome de *bacillus caspicus*. Ao passo que esta mistura matava invariavelmente os animaes, isolados, elles nenhum mal lhes faziam.

Resultados analogos foram obtidos com a mistura do vibrião cholerico e uma bacteria aquatica, e ainda com aquelle e uma especie de coli-bacillo encontrado no intestino da vacca. Nencki pensa que taes experiencias fornecem a prova cabal de que o cholera asiatico é uma infecção mixta, devida á associação do bacillo virgula com as bacterias mencionadas.

Sómente elle engana-se quando quer estabelecer a

identidade entre a molestia dos seus roedores e o cholera asiatico. As manifestações morbidas são inteiramente differentes nos dois casos, e com certeza (o que ainda é mais importante) a molestia é devida a invasão do *bacillus caspicus* no organismo dos coêlhos, tanto que foi elle encontrado não sómente no ponto de inoculação como tambem nos orgãos internos dos animaes mortos. E' que estes bacillos não eram bastante virulentos para por si sós infectar o organismo : foi preciso o concurso da toxina do vibrião cholerico, que no caso foi o microbio coadjuvante : alguma cousa de analogo ao que faz-se correntemente em bacteriologia, quando quer-se exaltar ou reforçar (é o termo) a virulencia de uma bacteria, com productos toxicos de uma outra.

Esta affecção communicada aos coêlhos por Nencki e seus dois discipulos Blachstein e Zumft nada tem, pois, de commum com o cholera intestinal e nem mesmo com a peritonite dos cobayos.

Já mencionamos em outra parte as tentativas feitas para resolver-se o problema do cholera intestinal dos animaes. Ultimamente Issaeff e Kolle procuraram desenvolver a molestia em coêlhos novos, pesando quinhentas grammas,e para isso recorreram á alcalinisação artificial do estomago ; mas apezar de tudo só obtiveram resultados insignificantes.

O methodo seguido no «Instituto Pasteur» tem dado melhores resultados. Os roedores novos (cobayos e coêlhos ainda mamando) contrahem facilmente o cholera intestinal sem previa neutralisação da acidez do succo gastrico, desde que se lhes administre o vibrião cholerico juntamente com outros microbios, como a *sarcina*, a *torula* e o *bacillo coliforme*. N'estas condições os pequenos animaes adquirem regularmente um cholera mortal, ás vezes acompanhado de diarrhéa, outras vezes sob a forma sêcca. No grosso intestino accumula-se uma grande quantidade de um exsudato seroso, uma especie de liquido inteiramente simi-

lhante á diarrhéa riziforme do cholera humano; os animaes não apresentam, porém, uma hypothermia progressiva como no homem. Sem os microbios *coadjuvantes* mencionados os roêdores podem tambem adquirir a molestia, mas isso da-se raramente. Sob a influencia da associação microbiana não se reproduz a infecção mixta: os microbios coadjuvantes depois de terem desempenhado o seu papel cedem o logar ao bacillo virgula, que por si só produz d'ahi por diante os symptomas do cholera. Da-se um phenomeno similhante ao que se passa no tetano: os symptomas tetanicos são devidos ao bacillo do tetano; mas este, para fixar-se no organismo e manifestar suas propriedades pathogenicas, deve ser secundado por outras bacterias. O cholera intestinal do coêlho de mamma é uma molestia contagiosa que transmitte-se facilmente a outros animaes da mesma especie, por intermedio das tetas da mãi. Esta expansão epidemica approxima ainda a molestia obtida experimentalmente no «Instituto Pasteur» do cholera humano; esta similhança entre as duas molestias permitte formar-se um juizo mais preciso sobre o caracter essencial do cholera verdadeiro. Nos coêlhos elle deve ser considerado uma intoxicação do organismo pela toxina elaborada no intestino, pelo vibrião: o sangue e os tecidos só excepcionalmente são invadidos pelo bacillo; pódem estar completamente indemnes e entretanto os animaes morrem com os symptomas caracteristicos. No homem tambem o vibrião limita-se ao intestino e muito raramente generalisa-se. Koch, depois de ter notado este facto capital, declarou que considerava o cholera humano uma molestia essencialmente toxica. — A descoberta de um meio facil e seguro de produzir o cholera experimental nos animaes de laboratorio permitte encarar-se agora com mais segurança os methodos propostos para a prevenção e cura do cholera humano.

Depois da descoberta de Koch procurou se utilisar o conhecimento que tinha-se adquirido do microbio para

conter um dos mais terriveis flagellos que affligem a humanidade. A verificação de que o germen não dá espóros e da sua fraca resistencia aos diversos agentes de destruição, como a desecacção, ou a influencia dos antisepticos, servio de base a certas medidas praticas, taes como a desinfecção das habitações invadidas pelo cholera, ou de embarcações procedentes de paizes contaminados.

O facto de Koch e outros terem tambem insistido sobre a circumstancia de poder o vibrião viver na agua potavel e que esta é o principal vehiculo de contagio deu logar a a exigir-se uma agua isenta de qualquer suspeita, bem como ao emprego da agua fervida.

Finalmente fizeram-se numerosas investigações no sentido da orientação pastoriana de encontrar uma vaccina anti-cholerica. Logo que appareceu a epidemia de 1884 o Dr. Ferran, na Hespanha, começou a estudar a questão sob esse ponto de vista. Conseguio logo provocar uma molestia mortal nos cobayos pela inoculação sub-cutanea do bacillo virgula e procurar vaccinar os animaes com doses fracas do microbio vivo. Esta descoberta foi posta em duvida por varios sabios, que na occasião quizeram verifical-a; mas actualmente ella é acceita por todo o mundo.

E' certo que a maior parte dos vibriões cholericos é incapaz de provocar a molestia mortal dos cobayos, introduzidos os germens pela via hypodermica; mas inoculando-os no peritoneo o resultado é segura. A vaccinação contra a peritonite dos cobayos é hoje cousa facil e corrente nos laboratorios; emprega-se o methodo Ferran com culturas vivas, ou tambem lança-se mão de culturas filtradas na vela Chamberland.

Ferran não tardou em applicar a sua descoberta no homem; em verias provincias da Hespanha invadida pelo cholera elle vaccinou mais de *cincoenta mil* pessôas e segundo a opinião do experimentador hespanhol essa vaccina diminuio *seis vezes* a morbilidade e *dez vezes* a mortalidade

entre as pessôas vaccinadas, em confronto com as que deixaram de ser inoculadas. Infelizmente o Dr. Ferran não publicou dadas mais minuciosos, de sorte que é impossivel um juizo seguro sobre suas tentativas e sobre seu methodo.

Por occasião do reapparecimento do cholera na Europa, no decurso do anno de 1892, veio de novo a ordem do dia a vaccinação contra a molestia ; pôde-se então confirmar e desenvolver a descoberta de Ferran sobre a vaccinação contra a peritonite dos cobayos, provocada pelo bacillo virgula.

Haffkine vaccinou durante dois annos mais de 32,000 pessôas na India, servindo-se de culturas do vibrião em injecções sub-cutaneas. Os jornaes assignalaram resultados summarios a que não se póde prestar fé ; em todo o caso mortalidade era maior do que a obtida por Ferran.

O melhor resultado conseguido por Hafkine refere-se a um regimento de Cawnpore, no qual todas as pessôas vaccinadas treze mezes antes ficaram indemnes ; ao passo que deram-se 19 casos de cholera entre os soldados não vaccinados. E' difficil acceitar que tenha sido aquella immunidade devida á vaccinação, porque mesmo nos animaes quando ella parece efficaz só protege durante alguns mezes (Ferran limita o prazo a dois mezes) ; duas pessôas que submetteram-se á celebre experiencia feita no «Instituto Pasteur» e que seis mezes antes tinham sido vaccinadas em Pariz por Haffkine, ambas adoeceram como as que nunca tinham sido inoculadas.

A descoberta da propriedade preventiva e curativa do sangue e do leite dos animaes vaccinados contra as molestias infectuosas, tem sido applicada por varios bacteriologistas ; Lazarus e Klemperer usaram do sangue ; mais tarde Ketcher applicou o leite e verificou-se que esses liquidos preservam os cobayos contra a peritonite dos cobayos.

Instruidos pelo que se dá no tetano e na diphteria,

pensaram alguns bacteriologistas que se tratava aqui de uma acção antitoxica: mas as investigações feitas por Pfeiffer e Wassermann demonstraram plenamente que na injecção previa, quer o serum, quer a vaccina com os bacillos premunem os animaes contra a *infecção* dos microbios e nunca contra a *intoxicação* pelo veneno do vibrião.

Diante da differença fundamental entre a peritonite do cobayo, que é uma infecção produzida pelo bacillo pullulando na lympha e no sangue, e o cholera intestinal, que é uma intoxicação devida ao veneno elaborado no intestino pelo vibrião, podia-se esperar uma acção muito diversa do serum preventivo nas duas molestias. De facto, as experiencias feitas demonstram que a quantidade de serum sufficiente para preservar quinhentos cobayos, da peritonite cholerica, é incapaz de preservar um coêlho de mamma contra o cholera intestinal.

Os ensaios feitos até agora para curar o homem cholerico não têm dado resultados; concluir-se d'ahi, porem, pela impossibilidade de lutar contra o cholera n'esse terreno, não seria justo; somente é preciso encontrar-se um serum capaz de agir contra a toxina: na sua ultima publicação Pfeiffer annuncia que já obteve um começo de propriedade anti-toxica em alguns dos seus sôros. No mesmo sentido trabalha-se em varios labaratorios da Europa.

Os epidemiologistas têm verificado que ha localidades indemnes de cholera; ás vezes a immunidade de uma população é passageira; outras vezes é duradora como em Versailles, Montpellier, Lyon, Stuttgart. etc. Da mesma maneira quando o cholera desenvolve-se em qualquer logar fica-se sorprehendido de ver a marcha que segue a epidemia, que expande-se ora uma incrivel rapidez, ora com inexplicavel lentidão.

Esse conjuncto de factos indica que a acção pathogenica do bacillo virgula depende de algumas condições particulares em que o microbio pode-se achar. A supposição de que a flora microbiana que cerca o vibrião cholerico

exerce uma grande influencia sobre acção d'aquelle organismo, levou os experimentadores á descoberta do cholera intestinal dos pequenos roedores; por isso tem-se o direito de pensar que no homem os mesmos factores intervêm para o desenvolvimento da molestia.

Esta hypothese, que ainda não pôde ser rigorosamente demonstrada, está muito de accôrdo com o que sabe-se da microbia e epidemiologia do cholera. Sanarelli mostrou que o vibrião cholerico pòde viver nas aguas de um dos logares indemnes classicos : a cidade de Versailles. A natureza cholerica d'esse vibrião deu, em uma experiencia no homem, um caso de cholera, tendo tambem sido verificada a propriedade de dar o phenomeno de Pfeiffer, por aquelle distincto bacteriologista. A immunidade local não tira, pois, ao vibrião a sua virulencia ; ella depende de outras causas, que devem revistir um caracter tambem local ; ora, entre os factores d'esta ordem deve-se collocar no primeiro plano a flora microbiana, que póde favorecer ou inhibir a acção do germen. Sobre os microbios favorecendo a acção do vibrião cholerico já ha factos bem estabelecidos ; mas no sentido opposto nada ha ainda feito. Entretanto proseguem os estudos n'esta direcção.

DIPHTERIA

SUMMARIO—O bacillo nas falsas membranas.—Pesquisas.— Coloração.—Isolamento sobre serum coagulado.— Colonias diphtericas.—Resistencia do bacillo.— Acção do germen sobre os animaes.—Paralysia diphterica experimental.— O bacillo não prolifera nos orgãos.—Attenuação do microbio.—Bacillo pseudo-diphterico.— Associações microbianas na diphteria.—Veneno diphterico nas culturas.—Paralysias toxicas.—Propriedades do veneno diphterico. — Immunidade conferida aos animaes.—Processos diversos.—Serum dos animaes immunisados.—Antitoxina.— Tratamento especifico da molestia ; seus resultados.

———

Foram principalmente os trabalhos de Klebs e de Lœffler que contribuiram para tornar conhecido o microbio da diphteria, que é uma molestia caracterisada essencialmente pela formação de falsas membranas resultantes de uma infiltração fibrinosa, seguida de mortificação do derma mucuso. Esta falsa membrana é de côr acinzentada e reproduz-se rapidamente toda a vez que é destacada. Em geral a molestia conserva-se localisada durante algum tempo e só mais tarde generalisa-se infeccionando o organismo.

Lœffler demonstrou a presença de microbios nas falsas membranas; mas os bacillos são difficeis de isolar. Para isso começa-se por semear um pedaço das falsas membranas sobre serum gelatinado. Tambem a cultura póde ser feita em tubos de gelatina, submettendo-se depois a uma temperatura de 20 ou 22 gráos centigrados.

Os bastonetes obtidos por este meio são immoveis e colorem-se facilmente com uma solução aquosa de *azul de methylene.* Elles têm alguma similhança com os bacillos da tuberculose, sendo, porém, um pouco mais delgados. As culturas aquecidas a 60.° ficam estereis.

A diphteria semeada em serum coagulado dá colonias salientes na superficie, apresentando no centro um pouco claro e na peripheria uma zona mais carregada. Em gelatina glycerinada o microbio cresce muito bem, mas suspende-se a cultura logo que o meio deixa de ser alcalino. Em caldo a proliferação do germen faz-se regularmente, sem que o meio fique turvo; apresenta um pequeno deposito no fundo do vaso, quando apparece a acidez; um pouco mais tarde a reacção muda e a cultura volta á alcalinidade. E' n'essa occasião que apparecem os crystaes phosphato-magnesianos, provenientes da transformação das materias azotadas em alcalis. Ha entretanto algumas raças do bacillo que turvam o caldo.

O microbio é aerobio-anaerobio, mas na presença do ar prolifera muito melhor. Em clara d'ovo, em batatas, em gelose, o germem cresce mal. Juntando-se a qualquer dos meios um pouco de assucar os resultados são mais apreciaveis, porém dentro de pouco tempo a transformação das materias hydro-carbonadas em acidos suspende a cultura.

Um bom meio de cultura para o bacillo da diphteria é um caldo obtido de carne velha, saturado de carbonato de cal; o microbio conserva-se vivo nos meios durante mezes. Não dá espóros e a 58.° morre. Os antisepticos fracos, que aliás o attingem difficilmente por causa da

membrana que o protege, tambem distroem aquelle micro-organismo rapidamente uma vez em contacto com elle.

Guardado em logar secco e ao abrigo da luz elle conserva-se durante annos: o Dr. Roux semeou com resultado um pouco de uma falsa membrana conservada durante *trinta annos* por um medico, cujo filhinho fallecera da molestia.

O bacillo de Klebs encontra-se principalmente na superficie das falsas membranas. Abaixo da superficie d'estas ha uma camada fibrinosa e com granulações, sob esta ainda ha uma tambem fibrinosa, mas reticulada, na qual encontram-se grupos do bacillo; mais abaixo ainda existe uma camada mucosa muito congestionada contendo globos sanguineos e leucocytas.

Outros microbios de natureza diversa da diphteria acham-se misturados com os de Klebs na superficie da membrana, ao contrario do que se dá nas camadas mais inferiores, onde quasi que só ha bacillos puros da diphteria.

Inoculados nos animaes os bacillos de Klebs dão uma molestia similhante á diphteria do homem, da qual morrem os animaes.

Um cobayo inoculado sob a pelle apresentará um edema no ponto picado e morrerá em 24 horas. O edema é coberto de estrias sanguinolentas; os vasos abdominaes são congestionados. Ha derramento pleural e hyperhemia para os rins. —As gallinhas e pombos succumbem rapidamente; o cão dura de tres a quatro dias, e a vacca e o carneiro tambem succumbem ao mal.

Para reproduzir-se a molestia com o seu cortejo habitual de symptomas, basta collocar o germen sobre uma mucosa lesada (estando intacta o microbio não prolifera); inoculado na trachèa de um coêlho este apresentará em breve o *croup* com os seus symptomas: ruido de bandeira (*bruit de drapeau*) suffocação, falsas membranas com os

bacillos e por fim a morte. Os ratos e os camundongos são refractarios á dipheteria.

A principio negou-se a especifidade do bacillo de Lœffler e attribuiu-se a producção de falsas membranas a estreptococcos ; de facto estes microbios estão muitas vezes associados ao da diphteria nas falsas membranas ; mas culturas puras do bacillo de Lœffler, inoculadas dão a *paralysia diphterica*, que jamais é produzida pelo estreptococco. Nos coêlhos essa paralysia começa pelos membros posteriores e vai invadindo progressivamente o corpo do animal até a morte, que é a terminação constante ; ao passo que as crianças escapam muitas vezes.

Querendo-se acompanhar o desenvolvimento do bacillo nos coêlhos inocula-se uma serie ao mesmo tempo e vai-se sacrificando successivamente cada animal 2, 4, 6, 8 horas depois da inoculação. Observa-se então que a cultura faz-se bem no começo, mas suspende-se depois, porque os microbios são envolvidos pelo exsudato fibrinoso das falsas membranas e não podem estender-se.

N'este caso porque a molestia é mortal ?—Simplesmente porque a diphteria não é de maneira alguma uma *infecção*, e sim uma *intoxicação* como veremos mais longe. E', pois, uma molestia especifica muito variavel em sua virulencia. Ha bacillos diphtericos que matam em 24 horas um cobayo de 500 grammas ; outros levam 6 e 8 dias para consummar a sua obra ; outros menos activos causam apenas lesões locaes de que o animal restabelece-se ; finalmente os ha tambem de uma virulencia nulla.

Consegue-se artificialmente tornar quasi neutro o bacillo : toma-se uma falsa membrana e semea-se ; ella vai apresentar diversos gráos de virulencia ; depois de tel-os ensaiado em varios animaes, escolhe-se aquella colonia que mostrou-se mais virulenta e semea-se em gelatina glycerinada ; a principio ella crescerá bem, até que a producção de acidos venha embaraçar o seu desenvolvimento. O bacillo collocado n'estas condições desfavoraveis perderá

gradualmente sua virulencia ; antes, porém, que elle morra, toma-se um pouco da cultura e semea-se em outro tubo de gelose glycerinada e assim por diante até que não haja mais virulencia.

Ha ainda outro processo : deixa-se sêccar e envelhecer uma falsa membrana em uma folha de papel ; semeando-se parcellas d'essa membrana em epocas differentes vê-se que cada dia as culturas vão se tornando menos activas.

Em resumo : no homem uma mesma membrana contém colonias de uma virulencia variavel. Esta virulencia pôde ser attenuada por meios artificiaes. O bacillo conserva-se por muito tempo, mas vai-se attenuando.

Nas pessôas gozando bôa saúde encontra-se nos productos da garganta o bacillo, que cultivado reproduz todos os signaes do bacillo de Klebs. Estes bacillos pseudo-diphtericos encontram-se nos serviços hospitalares de crianças doentes de sarampam ; é ahi que os doentinhos adquirem muitas vezes a diphteria. —Será um microbio differente do outro ? Pensa o Dr. Roux que trata-se simplesmente de uma forma attenuada do bacillo de Lœffler.

Ao lado das anginas diphtericas authenticas, ha outras de falsas membranas causadas por microbios differentes d'este que estudamos. Podemos citar as anginas causadas por estreptococcos, as do estaphylococcus, as do pneumococco e mesmo as do coli-bacillo. Ao lado d'estas apparecem no larynge e no pharynge outras lesões produzidas por um pequeno *coccus*, muito delgado e que foi visto pela primeira vez pelo Dr. Roux e por Yersin, denominado *coccus de Brison*, assim chamado porque foi o menino d'este nome que o forneceu. Esta criança entrou para o Hospital dos «Enfants malades» gravemente doente de croup, escapou, póde-se dizer, milagrosamente, tendo, em desespero de causa, soffrido duas vezes a operação da tracheotomia.

O *coccus de Brison* desenvolve-se em serum em colonias similhantes ás do bacillo diphterico, cultiva-se em

serum dando colonias similhantes ás do bacillo diphterico, mas as colonias são mais lisas e mais salientes.

O diagnostico pelo microscopio é em todos os casos de indeclinavel necessidade. Em um caso suspeito de diphteria procede-se assim : — toma-se um pouco das falsas membranas e faz-se immediatamente uma preparação entre lamina e laminula, que examina-se ao microscopio ; em seguida, e para maior segurança, semea-se a mesma membrana em tubos que são levados á estufa.

Si é mesmo da diphteria que se trata, as colonias apparecerão lá para a decima oitava hora. A precocidade das culturas não deixará n'este caso a menor duvida e o exame microscopico completará o diagnostico. Só o *coccus* de Brisou seria de capaz de proliferar tão depressa ; mas sendo a sua forma bem differente do bacillo de Klebs, a confusão não será possivel.

Deixando-se a cultura na estufa mais de 18 horas corre-se o risco de ver desenvolverem-se outras especies microbianas. Esta cultura fornece ainda indicações uteis para o prognostico :— bacillos longos entrelaçados, colonias numerosas indicam uma diphteria grave. Poucos bacillos, colonias raras, microbios curtos, collocados mais ou menos parallelamente, indicam, pelo contrario, que o caso será benigno.

E' necessario examinar se existe associação microbiana : si, por exemplo, encontra-se o estreptococco. Para reconhecel-o deixa-se a cultura envelhecer na estufa. Quando apparecem entre as colonias diphtericas pequenos pontos que tomam o *gram*, é que ha estreptococcos complicando o caso, cujo prognostico deverá ser considerado grave, porque é muito provavel a apparecimento da bronchopneumonia.

O facto de se acharem os ganglios cervicaes entumecidos e a côr pardacenta das falsas membranas indicam tambem a presença de estreptococcas. Si o microbio associado fôr o pneumococco devemos receiar terriveis

complicações para o pulmão ; e si fôr o estaphylococco é uma bronchite que virá aggravar a sorte do doente. Em summa, não é demais insistir-se sobre a importancia do diagnostico bacteriologico, mesmo porque muitas crianças entram indevidamente para os serviços destinados especialmente para a diphteria, molestia que os meninos podem n'este caso contrair.

O bacillo de Lœffler persiste na bocca dos convalescentes muito tempo depois da cura ; por isso em França nos serviços nosocomiaes não se dá alta ou boletim de *exeat*, sem que se esteja seguro, por exame microscopico e culturas muitas vezes repetidas, de que o bacillo desappareceu completamente. Além d'isso os ex-doentes devem fazer frequentes gargarejos e bochechos boricados.

Ha uma especie de *diphteria nasal* muito insidiosa, traduzindo-se por catharro do nariz, difficuldade de respirar e uma ligeira febre ; as pessôas affectadas constituem fócos ambulantes de contagio, visto como por manifestações tão ligeiras, ninguem guarda o leito. A's vezes ha certas soluções de continuidade na mucosa labial difficeis de sarar, porque contêm o bacillo ; eis ahi uma outra fonte de contagio.

Conservando os productos das falsas membranas sua virulencia durante muito tempo, segue-se que as desinfecções são de rigorosa necessidade ; essas desinfecções devem ser meticulosas e muito serias, não só nos aposentos como nos moveis, roupas de cama e do doente, mesmo quando já tenham decorrido alguns mezes.

Pelo que já conhecemos pode-se tirar algumas indicações sobre o tratamento : as cauterisações das falsas membranas, sobre serem inuteis são perigosas, como tudo que póde escoriar ou lesar a mucosa, o que daria logar á formação de novos fócos de cultura do bacillo. Os antisepticos são tambem inuteis porque não podem attingir os microbios, estando estes protegidos pelas falsas membranas, e quando são muito toxicos ha ainda o perigo da absorpção por

parte do doente, cujos rins não funccionam de modo a eliminar francamente os toxicos.

Deve-se permittir apenas, a titulo de asseio local a agua esterilisada ou fervida; ou então um pouco d'agua boricada, ou ainda misturada com hypochlorito de soda. O tratamento local tão em voga outr'ora, mas sempre sem resultados, perdeu inteiramente de importancia e foi completamente abandonado, depois do tratamento especifico recentemente descoberto pelo Dr. Roux e de que vamos nos occupar mais longe.

Conforme vimos o bacillo da diphteria inoculado em um cobayo desenvolve-se no ponto de inoculação sem espalhar-se pelos outros orgãos, não generalisa-se. Trata-se pois de uma molestia analoga ao carbunculo, ao cholera das gallinhas, ao *rouget* do porco, etc., nas quaes aliás encontra-se sempre uma grande quantidade do bacillo.

Na diphteria o numero de germens é muito mais limitado e não basta para explicar plenamente a infecção. E' preciso pois admittir se que o microbio não generalisando-se, não póde entrar directamente em conflicto com a cellula, não luta, por assim dizer, corpo a corpo com os elementos primordiaes do nosso organismo, mas o faz por intermedio de alguma cousa, e essa *alguma cousa* é o veneno por elle secretado, é a sua *toxina*, que absorvida vai perturbar profundamente a economia. E' portanto a diphteria uma doença toxica, como o demonstrou brilhantemente a bacteriologia e como já deixavam suspeitar as lesões necropisicas e os symptomas observados.

Si guardarmos durante tres ou mais semanas na estufa a 37ª uma cultura do bacillo diphterico, este desenvolver-se-á sob a forma de véo, cahindo mais tarde no fundo do vaso; si inocularmos um pouco d'esse liquido em um cobayo pesando 500 grammas o animal morrerá em 36 horas. Si o liquido tiver sido previamente filtrado na vela Chamberland veremos ainda que injectado na mesma dose (1/10 de centimetro cubico) matará o animal com a

mesma rapidez observada antes da filtração ; é pois evidente que no ultimo caso o animal succumbio á um envenenamento causado por substancias chimicas elaboradas pelo microbio. No primeiro dia a cultura (si ella foi semeada com microbios muito activos) é dotada de grande virulencia, mas é pouco toxica ; á proporção, porém, que vai envelhecendo, diminue de virulencia para tornar-se muito toxica.

Obtem-se a toxina pelo seguinte processo indicado pelo professor Roux :— toma-se um pouco de caldo de carne ligeiramente alcalino, tanto quanto baste para dar um ligeiro matiz azul ao papel de *tournesol ;* n'este caldo semea-se um bacillo reconhecido como muito virulento e leva-se a cultura á estufa aquecida a 37° gráos de calor.

Dentro de pouco tempo a formação de um véo nos indicará as bôas condições da cultura. A reacção do meio torna se acida, mas logo depois volta á alcalinidade primitiva, o que tambem é um outro signal do bom desenvolvimento do microbio. No fim de tres ou quatro semanas, ou mesmo de um tempo mais longo, o caldo possuirá uma toxidade elevadissima. N'estas condições basta filtral-o na vela Chamberland para poder ser empregado.

Por meio de um artificio pode-se precipitar as phases d'este desenvolvimento, tomando-se um balão de fundo chato e muito largo (dito de Fernbach), de modo a offerecer uma vasta superficie para ser bem arejada, e contendo duas tubuladuras, communicando uma d'ellas com uma trompa aspiradora de ar, emquanto que a outra contém agua até metade da altura dos dois ramos. Collocado o caldo no balão faz-se passar pela superficie do liquido uma corrente de ar humido (para evitar a evaporação) com a velocidade de dois a tres litros por hora. Este processo diminue de metade o tempo necessario para fazer-se a cultura.

A actividade do veneno diphterico não é sempre a mesma nas culturas feitas com o mesmo bacillo e nas mesmas condições, pelo que é preciso experimentar a viru-

lencia do producto obtido. Consegue-se esse resultado injectando-se sob a pelle de um cobayo de 400 a 500 grammas do peso, a decima parte de um centimetro cubico da toxina, que, para poder ser empregada na immunisação dos animaes destinados a fornecer o serum curativo, deve matar o cobayo em 48 horas.

O veneno ou toxina da diphteria introduzido no organismo dos animaes sensiveis á molestia dá os mesmos symptomas que lhes causam as inoculações de culturas vivas. Logo depois da injecção apparece um edema no ponto inoculado; mais tarde o animal torna-se dispneico e morre. Si a quantidade injectada não é grande o animal sobrevive á primeira phase do mal, mas apparecem as paralysias diphtericas typicas, que no fim de alguns dias dão a morte.

O veneno diphterico é destruido a 100° de temperatura; exposto durante 12 horas consecutivas a 58° fica muito enfraquecido, de modo á não matar mais um cobayo, na dose de um centimetro cubico. Certos agentes chimicos, os fermentos pepsicos, o destroem. O alcool, os agentes oxydantes, a agua oxygenada, os hypochloritos alcalinos, o trichlorureto de iodo, ou o proprio iodo, enfraquecem em gráos diversos o veneno diphterico; a propriedade d'esses corpos serve para attenuar a toxina destinada ás immunisações.

Nos animaes chamados de laboratorio (cobayos, coêlhos, ratos, etc.) consegue-se raramente habituar o organismo ás dóses fracas da toxina: os animaes morrem de cachexia; entretanto Brieger, Kitasato, Roux, Nocard e Martin têm obtido resultados satisfatorios em varias occasiões e seguindo precessos mais ou menos analogos.

Em 1890 Behring e Kitasato escreveram uma memoria em que revelavam as propriedades do sangue dos animaes immunisados contra a diphteria: o sangue desses animaes era capaz de destruir o veneno diphterico *in vitro* e no organismo; esta propriedade subsiste intacta no serum desembaraçado dos elementos figurados.

Estes factos que vinham constituir os primeiros elementos para a serotherapia do *croup*, não permittiram a applicação do methodo na pratica medica ; só mais tarde com os estudos profundos sobre o assumpto e com os aperfeiçoamentos introduzidos pelo professor Roux pôde a serotherapia passar a ser o processo curativo mais efficaz que já existio para a diphteria. Este facto auspicioso e notavel para a historia da medicina data do anno de 1894, quando no Congresso de hygiene, reunido em Budapest o Dr. Roux leu a sua celebre memoria, assignada tambem pelo seu collaborador Yersin, peça notavel e que passa com razão por ser o trabalho mais completo e perfeito que até hoje tem-se feito em bacteriologia. Na exposição do methodo e mais processos relativos a immunisação dos animaes para a producção do serum curativo e suas applicações praticas cederemos a palavra aos seus autores e collaboradores.

O animal escolhido é o cavallo, não sómente porque o seu serum é inoffensivo para o homem, mesmo quando administrado em grandes doses, como tambem porque aquelle animal supporta melhor do que outro qualquer o veneno diphterico, tendo ainda a vantagem de fornecer grandes quantidades do serum, de uma só vez.

O cavallo destinado á immunisação deve ter de 6 a 9 annos de idade, ser bem nutrido e não apresentar nenhuma lesão. Antes de começarem as inoculações destinadas a immunisal-o faz-se a prova da *malleina* (Vid. *Mormo*) para ter-se a certeza de que o animal não è mormoso. Primeiramente faz-se uma pequena injecção subcutanea atraz da espadoa, de uma toxina matando em 48 horas um cobayo de 500 grammas, na dóse de 10 centigrammas. Em dóses crescentes, mas inoffensivas e guardando o intervallo de alguns dias vai-se continuando a inocular a toxina, apresentando o animal apenas ligeiro edema local, bem como um pequeno augmento da temperatura no dia da injecção.

Eis aqui um quadro representando a immunisação de um cavallo pelo processo Roux.

E' copiado das notas originaes existentes em Garches, nos arredores de Pariz, que é o logar onde estão installadas as baias para os cavallos destinados á fabricação do soro antidiphterico:

Cavallo de 7 annos, pezando cerca de 400 kilogrammas. A toxina empregada mata um cobayo de 500 grammas em 48 horas, na dose de *um decimo* de centimetro cubico.

No 1.º dia injectou-se	1/4 de c.c.	toxina iodada 1/10. Não houve reacção.
» 2.º » »	1/2	» » » » » »
» 4º, 6º, 8º dia	Nada.	
» 13º, 14º » »	1 c.c.	toxina iodada 1/10. Não houve reacção.
» 17º » »	1/4 c.c.	toxina iodada. Ligeiro edema sem febre
» 22º » »	1 c.c.	» » » » » »
» 23º » »	2 c.c.	» » » » » »
» 25º » »	3 c.c.	» » » » » »
» 28º » »	5 c.c.	» » » » » »
» 30º, 32º, 36º dia	5 c.c.	» » » » » »
» 43º, 46º, 48º »	30 c.c.	toxina pura. Edema consideravel, dissipado em 24 horas.
» 53º dia	60 c.c.	» » » » » » »
» 57º, 63º, 65º, 67º dia	60 c.c.	» » » » » » »
» 72º dia	90 c.c.	» » » » » » »
» 89º »	260 c.c.	» » » » » » »

Este cavallo recebeo, pois, no decurso de 80 dias cerca de 800 centimetros cubicos de toxina apresentando apenas um edema passageiro com o augmento de um gráo de temperatura, quando as injecções erão maiores. Sangrado no 87º dia este mesmo animal recebeo uma nova injecção de 200 c. c. de toxina, sem inconveniente.

Em media são necessarios tres mezes para a immunisação de um cavallo. Terminadas as injecções de toxina deixa-se o animal repousar durante 8 ou 10 dias antes de tirar-se-lhe o sangue. Um cavallo póde fornecer cerca de *quatro litros* de sangue em cada sangria; esta pode ser repetida, guardando-se intervallos de 20 ou 30 dias. Pratica se a sangria na jugular, por meio de trocart, ficando a canula ligada a um tubo de borracha que despeja em um

boccal, tudo rigorosamente esterilisado, segundo technic bacteriologica. O sangue é então abandonado á coagulação espontanea e pode fornecer dois litros de serum. Havendo muitos animaes ao mesmo tempo a fornecer serum é conveniente misturar o sangue de todos elles, porque assim obtem-se um serum uniforme.

Trata se agora de conservar o serum; para isto tomase uma pipetta de Chamberland, aspira-se o liquido, que é dividido então pelos pequenos frascos; em cada um d'estes bota-se um pequeno pedaço de camphora previamente passada pela chamma do gaz como agente de conservação; o frasco é finalmente fechado com uma rolha de borracha esterilisada e guardado ao abrigo da luz. Na Europa o serum assim conservado dura mezes e annos com as suas propriedades normaes. Tambem é possivel conservar-se o serum no estado solido fazendo-o evaporar no vasio; quando quer-se fazer uso d'elle é só juntar-lhe 8 ou 10 vezes o seu volume de agua esterilisada; mas esta solução tem o inconveniente de produzir um edema passageiro; é por isso que na Europa preferem a forma liquida e só expedem o serum secco para os paizes do clima tropical, onde o producto liquido perde rapidamente as suas propriedades. Emfim o cavallo que está fornecendo o soro deve ter a sua immunidade entretida por novas injecções de toxina, injecções que podem ser feitas de uma só vez (300 a 500) no momento mesmo em que se acabou de retirar-lhe sangue e pela mesma canula que para este fim temse deixado no logar; ou então, o que é mais util, recorre se ás injecções subcutaneas repetidas.

Na Allemanha o methodo de immunisação correntemente empregado é o de Behring; em Höchst-sobre-o Mein, nas proximidades de Frankfort, existe uma grande installação de mais de 600 cavallos, que fornecem o serum antidiphterico em larga escala.

Os primeiros trabalhos de Behring sobre serotherapia antidiphterica repousavam sobre o principio do enfraque-

cimento das culturas pelo trichlorureto de iodo ; elle injectava dóses crescentes de culturas, cada vez contendo menor quantidade de trichlorureto de iodo. Em pouco tempo elle obtinha o que elle chamava *base de immunidade (Graundimmunität).*

Transposta essa 1ª phase do processo elle inoculava então dóses crescentes e completava a resistencia organica. As quantidades e os intervallos das doses eram calculados segundo a duração e intensidade da ultima reacção : as dóses só eram augmentadas quando a ultima injecção tinha sido supportada pelo animal sem a menor reacção.

Roux no seu processo tambem juntava á sua toxina um pouco de iodo, sob a forma de licor de Gram ; mas hoje esta addição tornou-se facultativa. e em Pariz é indifferente começar a immunisar-se com a toxina iodada ou pura.

Quando se tem feito uma serie prolongada de injecções e tem-se motivo para suppôr terminada a immunisação pratica-se a sangria conforme já deixamos indicado e divide-se o serum por pequenos frascos onde elle ficará conservado com um pouco de camphora ou acido phenico ; é necessario, porém, conhecer o valor anti-toxico do serum antes de empregal-o como meio therapeutico.

Roux injecta o serum antidiphterico em um cobayo de 500 grammas na dóse de *um centesimo* de centimetro cubico ; vinte quatro horas depois injecta 1,2 c. cubico de cultura virulenta de diphteria ; si o animal resiste, isso é : se a dóse serum foi sufficiente para neutralisar a acção da toxina, elle considera o soro capaz de ser utilisado no homem.

Behring estabeleceu a unidade antitoxica do que elle chama *serum normal*, que é aquelle que na dóse de 10 centigrammas neutralisa exactamente *um* c. cubico do veneno. Um centimetro cubico d'este serum contém portanto uma *unidade-behring.* O bacteriologista berlinez estabeleceu que a dóse therapeutica simples é equivalente a *600*

unidades, que vem a ser o minino que se deve injectar para inicio de tratamento.

Ehrlich notou que o leite dos animaes immunisados tinha propriedades anti-toxicas ; este facto, porém, tem apenas o interesse de uma descoberta theorica e de nenhum valor pratico, porque a extrema diluição da toxina no leite impedede de lançar-se mão d'este liquido para o tratamento dos doentes.

Confirmado pelo exame microscopico e bacteriologico, ou simplesmente suspeitado como tal um caso qualquer de *croup*, deve-se sem perda de tempo tratal-o por meio das injecções de serum antidiphterico ; e, tendo em vista a mais rigorosa asèpsia, escolhe-se uma seringa especial de capacidade de 10 c. c. ou mesmo mais, e esterilisa-se em uma solução de soda a 1 %, que é aquecida a 100° e onde a seringa é deixada durante cinco minutos ; em seguida pratica-se a injecção. Quanto á seringa, tanto o modelo de Koch, como o de Roux preenchem bem o fim que se tem em vista.

O logar do corpo em que deve ser feita a picada nenhuma importancia tem e cada um escolhe o que lhe parece melhor. A pelle é lavada com agua quente e sabão e esfregada com uma escova aspera, depois com alcool e com uma solução phenicada ou de sublimado. Não é necessario *massar* a região após a injecção : a reabsorpção do serum faz-se rapidamente, de sorte que a proeminencia local desapparece logo. No logar da picada passa-se um pouco de collodio iodoformado.

A questão da quantidade de serum a injectar em um caso de *croup* tem uma grande importancia, pois não basta, como muito bem diz o Dr. Funck, chefe dos trabalhos do «Instituto Serotherapico» de Bruxellas, «começar-se por uma injecção de 20 c. c. de serum de Roux, ou de 10 c. c. de um dos tres sôros de Behring e limitar se a aguardar os acontecimentos ! O papel do medico em presença de um caso de *croup* deve ser muito mais activo : as ultimas

estatisticas mostram a vantagem de injectar-se uma dóse *sufficiente* de anti-toxina, segundo a gravidade do caso.»

De facto assim é: a dosagem varia com a phase em que a molestia está; varia com o processo morbido local, com a existencia de uma infecção secundaria, com a idade de criança, etc. Nos serviços hospitalares que empregam o serum mais concentrado é onde tem-se colhido os melhores resultados.

O professor Roux recommenda para as anginas diphtericas puras duas ou tres injecções, representando de 40 a 50 c. c. de serum; e para as anginas associadas cerca de 70 c. c. Quando a associação microbiana é com o estreptococco, além do serum antidiphterico, injecta-se tambem o serum de Marmorek. Na Allemanha a grande fabrica explorada em Höchst pela firma Meister Lucins e Brüning, sob a fiscalisação de uma commissão official, fornece tres especies de serum:

Nº 1· contendo 600 *unidades-behring* em 10 c. c., representando a dóse therapeutica mais simples applicavel a todas as crianças de tenra idade e bastando, sempre que o tratamento tem começado no 1· ou 2· dia molestia.

Nº 2 contendo *mil unidades*, em 10 c. c., applicavel aos casos de media intensidade.

Nº 3 contendo 1,500 *unidades*, recommendado nos casos graves, ou para os doentes que começaram tarde, ou ainda para aquelles que tenham o larynge compromettido por qualquer forma.

Para os adultos qualquer d'estas dóses é insufficiente: ellas devem ser repetidas pelo menos uma vez, de seis a dozes horas depois da primeira injecção; por segurança tambem deve-se proceder assim com os meninos maiores de cinco annos.

Um dos effeitos mais promptos das injecções de sôro antidiphterico é a melhora brusca do estado geral do

doente, affirmam todos que applicam ou têm visto applicar o novo tratamento.

Em seguida a formação de falsas membranas é rapidamente suspensa e, segundo nota o Dr. Roux, ellas desapparecem no fim de 36 a 48 horas.

Quando a intervenção é tardia e o caso é grave pode-se não conseguir tão brilhante successo ; as falsas membranas ameaçam o doente de asphyxia immediata e não ha remedio senão recorrer a tracheotomia, que tornou-se quasi desnecessaria com o novo remedio ; e com a *intubação ou tubagem do larynge*, processo reimportado recentemente da America do Norte em França, onde tinha sido descoberto em 1848 pelo professor Bouchu ; mas este modesto e operoso author teve a má sorte de ter contra o seu precioso invento a immensa authoridade de Trousseau que preconisava a tracheotomia ; de modo que o processo não teve quasi applicação em França e cahiu no esquecimento.

Agora, porém, foi elle reimportado por alguns medicos e tem sido calorosamente preconisado pelo Dr. Chaillou, como bem superior á sangrenta tracheotomia, nos poucos casos em que esta era ainda empregada, apezar do tratamento especifico ; de sorte que com os dois processos combinados, a abertura da trachéa é hoje inteiramente excepcional, emquanto que outr'ora era a regra ; salvava, é certo, os doentes da asphyxia immediata, mas era impotente diante da intoxicação produzida pelo veneno diphterico.

Não acontece mais assim com o novo tratamento Behring-Roux, que fez baixar immediatamente e por toda a parte a porcentagem da mortalidade produzida pela terrivel molestia, considerada o terror das mãis, que hoje só podem bemdizer os authores, que na phrase de um distincto bacteriologista, «escreveram um dos mais bellos capitulos da therapeutica».

FIM

INDICE

sagens successivas.—Toxina elaborada pelo *bacillus anthracis*.—Vaccinação pela toxina. —Propriedade do serum dos animaes immunisados contra o carbunculo.—Modo de vaccinar.

—⸙—

DR. RODOLPHO GALVÃO

NOÇÕES DE BACTERIOLOGIA

RECIFE

1899